Untersuchungen am Muskelmagen des Regenwurms Lumbricus terrestris L. (Annelida, Oligochaeta) unter besonderer Berücksichtigung der Chitinsynthese

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Volker Walldorf
aus Hohenlimburg

Düsseldorf 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0107

Untersuchungen am Muskelmagen des Regenwurms Lumbricus terrestris L. (Annelida, Oligochaeta) unter besonderer Berücksichtigung der Chitinsynthese

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Volker Walldorf
aus Hohenlimburg

Düsseldorf 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Peters

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.- D. Spindler

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung 3

B. Material und Methoden 8

1. Versuchstiere 8

2. Versuche mit ^{14}C - Glukose in vivo 8

3. Präparation des Muskelmagens 9

4. Herstellung von Homogenaten des Muskelmagenepithels..... 10

5. Fraktionierung von Epithelhomogenaten durch Differentialzentrifugation 10

6. Inkubation von Muskelmägen in vitro 11

7. Inkubation von Epithelhomogenaten 12

8. Radioaktivitätsmessung 12

9. Chitinbestimmung 13

10. Bestimmung von Uridindiphosphat 15

11. Proteinbestimmung 16

12. Identifizierung des Reaktionsproduktes der Inkubation mit UDP - GlcNAc 17

13. Elektronenmikroskopische Untersuchungen. 19

14. Bestimmung der Protease- und Amylase-aktivität 20

C. Ergebnisse 21

1. Der Bau des Muskelmagens 21

2. Die sogenannte Kutikula des Muskelmagens 22

3. Umsatz von ^{14}C - Glukose in vivo 24

4. Chitinsynthetaseaktivität 25

4.1 Identifizierung des Reaktions-produktes 25

4.2 Aktivität der Synthetase in ganzen Muskelmägen 26

Seite

4.3 Inkubation von Epithel-homogenaten 27

4.3.1 Aktivitätserhöhung durch Detergentien 27

4.3.2 Aktivierungsversuche mit Proteasen 29

4.3.3 Der Einfluß von N - Acetyl-glukosamin 31

4.3.4 Hemmung durch Uridindiphosphat. 34

4.3.5 Die Wirkung von Inhibitoren der Chitinsynthese 35

4.3.6 Der Einfluß von Komplexbild-nern und zweiwertigen Metall-ionen 38

4.3.7 Ergebnisse der Differential-zentrifugation 42

5. Die Aktivität weiterer im Muskelmagen nachweisbarer Enzyme 45

5.1 Proteaseaktivität 45

5.2 Amylaseaktivität 47

D. Diskussion 48

E. Zusammenfassung der Ergebnisse 67

F. Literaturverzeichnis 70

G. Abbildungen 78

A. Einleitung

Polysaccharide sind sowohl im Tier- wie auch im Pflanzenreich entscheidend am Aufbau von Stützelementen beteiligt. Bei den Pflanzen ist vorwiegend die Zellulose anzutreffen, während die Mehrzahl der Pilze und die Tiere Chitin synthetisieren. Als Ausnahme im Tierreich bilden die Tunikaten in ihrem Mantel Zellulose (Ranby, 1952); außerdem wurde Zellulose bei bestimmten Erkrankungen des Menschen im Bindegewebe nachgewiesen (Hall et al., 1958). Am bekanntesten ist das chitinhaltige Exoskelett der Arthropoden, in dem Chitin in Form von Mikrofibrillen auftritt. Daneben ist Chitin aber auch bei der Mehrzahl der anderen Tierstämme nachweisbar (Jeuniaux, 1963; Muzzarelli, 1977).

Die Synthese beider Polysaccharide war im letzten Jahrzehnt Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Das Substrat der Zellulosesynthetase ist UDP - Glukose bzw. GDP - Glukose (Barber et al., 1964; Elbein et al., 1964). Bei einer Anzahl von Untersuchungsobjekten gelang es, eine Verknüpfung des Substrats zu Zellulosemolekülen in vitro zu erreichen; teilweise jedoch führten die Inkubationen von zellfreien Präparationen nur zur Bildung von Zellulosevorstufen (Ward und Wright, 1965; Brummond und Gibbons, 1965; Wang und Bartnicki-Garcia, 1966; Flowers et al., 1968; Ray et al., 1969).

Entsprechende Versuche wurden mit UDP - N - Acetylglukosamin (UDP - GlcNAc) als Substrat an chitinsynthetisierenden Objekten durchgeführt. Die meisten Kenntnisse über die Chitinsynthese und insbesondere die Chitinsynthetase (E.C. 2.4.1.16) als letztem Glied der Enzymkette wurden durch Untersuchungen an chitinbildenden Pilzen gewonnen. Nachdem es erstmals mittels einer aus dem Pilz Neurospora crassa gewonnenen Fraktion gelungen war, Chitin in vitro aus radioaktiv markiertem UDP - GlcNAc zu synthetisieren (Glaser und Brown, 1957), wurde versuchr eine chitinsynthetasehaltige Fraktion aus den verschiedensten Pilzen herzustellen (Porter und Jaworski, 1966; Camargo et al., 1967; Cabib und Bowers, 1971; Ruiz-Herrera und Bartnicki-Garcia, 1974; Jan, 1974; Gooday und de Rousset-Hall, 1975; Archer, 1977; Vermeulen et al., 1979). Im Verlauf dieser Untersuchungen stellte sich heraus, daß den Chitinsynthetasen aller Untersuchungsobjekte trotz einiger Unterschiede bestimmte Charakteristika gemeinsam sind. So etwa die Abhängigkeit von Mg^{2+}- Ionen und ihre Hemmung durch das Nukleotid Uridindiphosphat (UDP) (Keller und Cabib, 1971; McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971; Jan, 1974; de Rousset-Hall und Gooday, 1975), die kompetitive und relativ spezifische Hemmung durch das Antibiotikum Polyoxin (Endo et al., 1970) und die Tatsache, daß das Enzym membrangebunden ist (Cabib und Bowers, 1971; Jan, 1974; Vermeulen et al., 1979); Versuche zur Lokalisierung der Chitinsynthetase in der Zelle zeigten, daß die Zellmembran offensichtlich Sitz des Enzyms ist.

Die Untersuchung der Chitinsynthese bei Tieren begann mit Versuchen an der Wüstenheuschrecke Schistocerca gregaria (Candy und Kilby, 1957); hierbei wurde der Ablauf der Chitinsynthese von der Glukose bis zum UDP - N - Acetylglukosamin nachvollzogen (Abb. 1). In der Folge wurde die Chitinsynthese verschiedener Arthropoden an Gewebeteilen und zellfreien Extrakten untersucht (Jaworski et al., 1963; Porter und Jaworski, 1965; Carey, 1965; Hohnke, 1971; Surholt und Zebe, 1972; Surholt, 1975; Vardanis, 1976; Quesada-Allue et al., 1976). Zwar wurde bei fast allen Untersuchungen ein Einbau markierten Substrats in Chitin beobachtet, jedoch wurden meist, insbesondere bei zellfreien Systemen, keine den Pilzpräparationen vergleichbaren Ergebnisse erzielt.

Allen diesen Untersuchungen ist gemeinsam, daß das Integument als Enzymquelle diente. Möglicherweise liegt darin ein Grund für die unbefriedigenden Ergebnisse bei den zitierten Versuchen. So scheint die Chitinsynthetase des Integuments besonders empfindlich gegenüber Milieuänderungen zu sein, da Versuche ein Homogenat herzustellen, oftmals zum sofortigen Verlust der Enzymaktivität führten (Vardanis, 1976). Dazu kommt die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Häutungszyklus (Hornung und Stevenson, 1971; Hohnke, 1971; Surholt und Zebe, 1972; Gwinn und Stevenson, 1973; Surholt, 1975; Vardanis, 1976), welche die Bereitstellung ausreichender Mengen gleichwertigen Versuchsmaterials erschwert.

Neben dem Integument gibt es weniger bekannte Gewebe, die offenbar kontinuierlich Chitin synthetisieren. Dabei handelt es sich zum Beispiel um Darmepithelien, die eine chitinhaltige peritrophische Membran bilden (Peters, 1968), und fernerhin um Bereiche im Darm zahlreicher Mollusken und Anneliden, die eine Kutikula abscheiden, welche ebenfalls Chitin enthält. Das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit, der Regenwurm Lumbricus terrestris, bildet nicht nur peritrophische Membranen, sondern in seinem Muskelmagen auch eine chitinhaltige sogenannte Kutikula (Vierhaus, 1971). Autoradiographische Untersuchungen der Muskelmagenkutikula ^{3}H - Glukosebehandelter Würmer führten zu dem Schluß, daß die Kutikula kontinuierlich gebildet und ihr gesamtes Material innerhalb von 48 - 60 Stunden nahezu vollständig erneuert wird (Peters, unveröffentlicht). Diese Tatsachen und in ausreichenden Mengen beschaffbares Material führten zur Wahl dieses Versuchstiers. Daneben erschien es von besonderem Interesse auch die Wirkung von Hemmern der Chitinsynthese auf einen Nichtarthropoden zu untersuchen; insbesondere deshalb, da neurere Insektizide, die schon in Freilandversuchen erprobt werden, eine solche Hemmung bei Arthropoden bewirken und der Regenwurm infolge seines Bodenlebens ebenfalls davon betroffen sein könnte.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Herstellung eines zellfreien Systems, das eine aktive Chitinsynthetase enthält, und wenn möglich, eine vorläufige Charakterisierung dieses Enzyms vorzunehmen, die Wirkung von bekannten Inhibitoren der Chitinsynthese zu testen, sowie Informationen zur

Regulation und zur Lokalisation der Chitinsynthetase zu erhalten. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob das Epithel des Muskelmagens möglicherweise auch als Bildungsort der im Mageninhalt nachweisbaren Enzyme in Frage kommt.

B. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Die Regenwürmer, Lumbricus terrestris L., wurden aus Anglergeschäften bezogen, wo sie als Tauwürmer im Handel sind. Sie wurden in Klimakammern in Plastikschüsseln gehalten, in deren Boden sich ein Abflußgitter befand. Jede Schüssel (30 x 30 x 15 cm) war mit etwa 30 geschlechtsreifen Würmern besetzt. Die Temperatur in den Klimakammern mit 12 Stunden Tag - Nachtrhythmus betrug 10 - 12°C. Als Substrat wurde lehmhaltige Gartenerde, die mit Blumenerde vermischt war, verwendet. Zur Dränage wurde unter der Erde eine dünne Sandschicht eingebracht. Die Schüsseln wurden alle 2 - 3 Tage mit Wasser übersprüht, um ein Austrocknen des Substrats zu verhindern; überschüssiges Wasser konnte durch das Bodengitter abfließen. Gefüttert wurde mit Buchenlaub und welken Pflanzenteilen.

2. Versuche mit ^{14}C - Glukose in vivo

Regenwürmern von möglichst gleicher Größe wurden je 10 µl ^{14}C - Glukose (2 750 000 cpm) in 0,8%iger NaCl - Lösung injiziert. Die Tiere wurden nach der Injektion im Dunkeln bei 12°C auf feuchtem Fließpapier gehalten und 10 Minuten bis 65 Stunden nach Versuchsbeginn getötet, um die Kutikula des Muskelmagens herauszupräparieren. Jede Kutikula wurde in destilliertem Wasser gereinigt. Nach Einfrieren der

Proben und nachfolgender Gefriertrocknung wurden die Trockengewichte der Kutikulae bestimmt. Eine 24 - stündige Behandlung mit 1 M NaOH bei 100°C sollte Proteine und andere Inhaltsstoffe der Kutikula entfernen. Die Natronlauge wurde mit Aqua bidest ausgewaschen bevor die extrahierten Proben 12 Stunden mit Chitinase (1 mg Chitinase/ 1,5 ml 0,15 M Zitronensäure - 0,3 M Dinatriumhydrogenphosphat - Puffer) behandelt wurden. Die Höhe der Radioaktivität wurde sowohl im NaOH - Extrakt als auch im Chitinhydrolysat mit einem Beckman LS 8000 Szintillationszähler bestimmt; als Szintillationsflüssigkeit wurde Unisolve 100 (Zinsser, Szintillatoren) verwendet.

3. Präparation des Muskelmagens

Für die Untersuchungen der Chitinsynthetaseaktivität an ganzen Muskelmägen wurden diese aus den Würmern herauspräpariert, geöffnet und in 40 mM Tris/HCl - Puffer (pH 7,5), der 10 mM $MgCl_2$, 3 mM Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 3 mM ß-Mercaptoäthanol enthielt, gewaschen. Die Osmolarität des Puffers wurde jener der Cölomflüssigkeit des Regenwurms (160 mOsm; Prosser und Brown, 1965) mit Natriumchlorid angeglichen. Die gesamte Präparation wie auch die im Folgenden beschriebenen Präparationen wurde bei + 4°C ausgeführt.

4. Herstellung von Homogenaten des Muskelmagenepithels

Zunächst wurde die Kutikula aus den geöffneten und gesäuberten Muskelmägen entfernt. Da sich zwischen Epithelzellen und Muskelschicht eine dicke, kollagenhaltige Basalmembran befindet, ließ sich das Epithel relativ leicht mit einer Pinzette vom Muskel abziehen. Das fast muskelfreie Epithel von 10 Muskelmägen wurde in 2 ml des oben genannten Tris/HCl-Puffers ohne NaCl mit Hilfe eines motorgetriebenen Potter-Elvejhem Homogenisators mit Teflonpistill homogenisiert; das Homogenisiergefäß wurde dabei mit Eiswasser gekühlt. Sofern nicht anders angegeben, wurden Epihelhomogenate zur Bestimmung der Chitinsynthetaseaktivität in Gegenwart von 0,2% des Detergens Triton X-100 hergestellt.

5. Fraktionierung von Epithelhomogenaten durch Differentialzentrifugation

Die Zentrifugation wurde in Anlehnung an den Präparationsgang von Porter und Jaworski (1966) bei + 4° C vorgenommen. Das Homogenat wurde zunächst 15 Minuten bei 6200 x g in einer WKF Hitachi Ultrazentrifuge 65 P zentrifugiert, um Zellbruchstücke, Kerne, Mitochondrien und noch vorhandene Muskelanteile zu sedimentieren. Nachdem das Pellet dieses Zentrifugationsschrittes in 1 ml Tris/HCl - Puffer, der 0,1% Triton X-100 enthielt, suspendiert worden war, wurde diese Fraktion bis zur Inkubation bei + 4°C aufbewahrt. Der Überstand wurde weitere 60

Minuten bei 100 000 x g zentrifugiert. Das rotgefärbte Pellet wurde ebenfalls in 1 ml des obigen Puffers aufgenommen und suspendiert. Der 100 000 x g - Überstand wurde in Gegenwart von 0,1% Triton X-100 inkubiert. Inkubationslösung sowie Temperatur und Dauer der Inkubation entsprachen denen der Epithelhomogenate.

6. Inkubation von Muskelmägen in vitro

Die gesäuberten Muskelmägen wurden in zwei gleiche Teile zerschnitten, deren Naßgewicht vor der Inkubation bestimmt wurde. Das Naßgewicht der Muskelmagenhälften diente zur Angleichung der nach erfolgter Inkubation gemessenen Synthetaseaktivitäten. Da sich die Gewichte der Magenhälften immer um 20 mg bewegten, wurden alle cpm - Angaben auf dieses Gewicht bezogen. Eine Hälfte jedes Muskelmagens diente als Kontrolle und wurde vor der Inkubation für fünf Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt.

Die Inkubation erfolgte in 200 µl 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5), der neben 10 mM $MgCl_2$, 3 mM EDTA, noch 20 mM N - Acetylglukosamin (GlcNAc) sowie 0,5 mM UDP - GlcNAc und 50 nCi UDP - ^{14}C - (U) - GlcNAc (New England Nuclear Chemicals) mit einer spezifischen Aktivität von 235 mCi/mmol enthielt. In einigen Versuchen wurde statt UDP - GlcNAc Glukose als Substrat verwendet. Die Glukosekonzentration betrug 20 mM; von der ^{14}C - markierten Glukose, deren spezifische Aktivität 316 mCi/mmol betrug,

wurden 50 nCi eingesetzt. Die Inkubation dauerte 10, 30, 60 bzw. 90 Minuten bei einer Temperatur von + 25°C und wurde durch Zugabe von 800 µl 50%iger KOH gestoppt.

7. Inkubation von Epithelhomogenaten

Die Aktivität der Chitinsynthetase in Epithelhomogenaten wurde durch Inkubation von 100 µl Homogenat mit 100 µl Inkubationslösung bestimmt. Jeder Ansatz enthielt in einem Endvolumen von 200 µl 40 mM Tris/HCl - Puffer (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 3 mM EDTA, 20 mM GlcNAc sowie 0,5 mM UDP - GlcNAc und 50 nCi UDP-^{14}C - (U) - GlcNAc. Die Tritonkonzentration während der Inkubation betrug 0,1%. Bei Versuchen zur Aktivierung und Hemmung der Chitinsynthetase wurde die Inkubationslösung variiert, wie im Ergebnisteil bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Inkubationsdauer und -temperatur waren die gleichen wie bei ganzen Muskelmägen; die Reaktion wurde ebenfalls mit 800 µl 50%iger KOH gestoppt.

8. Radioaktivitätsmessung

Die mit KOH gestoppten Proben, sowohl die Muskelmagenhälften als auch die Epithelhomogenate bzw. deren Fraktionen, wurden im Thermostaten 2 Stunden lang bei 100°C erhitzt. Nach Abkühlen wurde jede Probe durch ein Millipore Zelluloseesterfilter

GS 2500 (0,2 µm Porengröße) filtriert und das Filter mit 150 ml destilliertem Wasser gewaschen. Zur Messung der Radioaktivität wurden die feuchten Filter in Unisolve 100 (Zinsser) überführt; für die im Thermostaten bei 100°C getrockneten Filter wurde Quickszint 294 als Szintillationsflüssigkeit benutzt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem Beckman LS 8000 Szintillationszähler.

9. Chitinbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des Chitingehaltes der Kutikula wurden vom Epithel des Muskelmagens abgezogene Kutikulae in destilliertem Wasser mit einem Pinsel von anhaftenden Nahrungs- und Schmutzpartikeln befreit. Nach erneutem Spülen in Wasser wurden die opak bis bernsteinfarben erscheinenden Kutikulae in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Auf einer elektronischen Mikrowaage Sartorius Typ 4431 wurde nach der Gefriertrocknung das Gewicht jeder Kutikula bestimmt; dieses Trockengewicht diente als Bezug für die später erfolgende Chitin- und Proteinbestimmung.

Zunächst wurden die getrockneten Kutikulae mit einer wässrigen Lösung von 5% Natriumdodecylsulfat (SDS)/ 8 M Harnstoff (1 ml/ Kutikula) mehrere Stunden bei 20 - 22°C behandelt, um Proteine und Glykoproteine zu entfernen. Danach wurden die Kutikulae in Wasser gespült und in 1 M NaOH für etwa 2 Stunden bei 100°C erneut extrahiert; diese zweite Extraktion sollte das Chitin von fester gebundenen

Resten der Matrix, möglicherweise Mucopolysacchariden (Proteoglykanen), befreien. Mit beiden Extrakten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Außerdem wurde versucht, mit dem Carbazoltest (Bitter und Muir, 1962) Uronsäuren nachzuweisen.

Die extrahierten Kutikulae wurden erneut mit Wasser gewaschen und dann der Chitingehalt jeder Probe mit der Methode von Jeuniaux (1963) bestimmt. Jede Kutikula wurde dazu in 2 ml 0,15 M Zitronensäure - 0,3 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer mit 0,92 mg Chitinase (Sigma) für 10 Stunden bei 37°C im Schütteltherm0staten inkubiert; zur Verhinderung von Bakterien- und Pilzwachstum befand sich in jeder Probe ein Thymolkristall. Nach der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert und 1,5 ml des Überstandes mit 2 ml ß-Glukosidase (500 mg/ 100 ml; Sigma) und destilliertem Wasser auf ein Volumen von 5 ml gebracht. Diese Lösung wurde dann weitere 4 Stunden unter ständigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Durch zehnminütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad wurde die Inkubation beendet und das denaturierte Protein durch Zentrifugation pelletiert.

Im Überstand wurde das durch den enzymatischen Abbau des Chitins freigesetzte N - Acetylglukosamin mit der Methode von Reissig et al. (1955) bestimmt. In jeder Probe wurde in je zwei Ansätzen die Menge des Aminozuckers bestimmt. Zu je 500 µl Probe wurden 100 µl einer 0,8 M Kaliumtetraboratlösung pipettiert und drei Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurden je 3 ml p-Dimethylbenzaldehyd (10 g in 100 ml Eisessig, der 12,5% (V/V) 10 M HCl

enthält) zu den Proben gegeben, gemischt und 20 Minuten im Wasserbad auf etwa 37°C erwärmt. Die Extinktion der auf Zimmertemperatur abgekühlten Proben wurde bei 585 nm bestimmt.

Als Kontrollen und Nullwert wurden zwei Proben inkubiert, von denen die eine alle Reagentien, jedoch keine Kutikula, die andere alle Reagentien außer Chitinase sowie eine Kutikula enthielt. Mit den Meßwerten dieser beiden Proben wurden die gemessenen Konzentrationen von N - Acetylglukosamin korrigiert, bevor die Chitinmenge berechnet wurde.

10. Bestimmung von Uridindiphosphat

Die Bestimmung der Konzentration von Uridindiphosphat im Epithelhomogenat erfolgte durch enzymatischen Umsatz des Nukleotids mit Hilfe von Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat (Leloir und Goldemberg, 1960). Je 500 µl Homogenat wurden mit 500 µl Tris/HCl - Puffer (pH 7,5) versetzt. Als Blindprobe diente 1 ml Puffer; als Standard dieser Puffer mit einer bekannten Menge UDP. Jedes Reaktionsgefäß enthielt neben den Proben 100 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, 2000 U/ ml; Merck); die Pyruvatkinase wurde vorher mit 100 mM $MgSO_4$ so verdünnt, daß sie noch 40 U/ ml enthielt. Pro Röhrchen kamen noch 50 µl Phosphoenolpyruvat (5 mM in 200 mM KCl) hinzu. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei 37°C. Nach der Inkubation wurden in jede Probe unter Schütteln 150 µl 0,1%iges

2, 4 - Dinitrophenylhydrazin in 2 M HCl pipettiert. Nach fünf bis zehn Minuten wurden 3,6 ml eines Gemisches aus 95%igem Äthanol und 10 M NaOH (3,4 ml + 0,2 ml) zugegeben und die Proben 20 Minuten bei etwa 1400 x g zentrifugiert; die Absorption der Überstände wurde bei 520 nm in einem Beckman Spektralphotometer M 25 gemessen.

11. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Da eine ganze Anzahl kleiner Abweichungen vom Originalrezept unter der Bezeichnung "Lowry" existieren, sei die hier verwendete Anordnung aufgeführt. Jede Probe wurde mit destilliertem Wasser auf 0,6 ml aufgefüllt. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Die zum Nachweis verwendeten Lösungen waren:

1.) 2%ige Na_2CO_3 - Lösung in 0,1 M NaOH
2.) 0,5%ige $CuSO_4$ - Lösung in 1%igem Natriumzitrat
3.) 1 N Folin - Ciocalteus - Phenolreagenz (Merck)

Zu jeder Probe wurden 3 ml Gemisch aus Lösung 1 und 2 (50 ml + 1 ml) gegeben. Nach 10 Minuten wurden 300 µl Phenolreagenz schnell hinzupipettiert, gut gemischt und nach etwa 30 Minuten die Extinktion bei 500 nm bestimmt.

12. Identifizierung des Reaktionsproduktes der Inkubation mit UDP - GlcNAc

Nach der Inkubation von Präparationen des Muskelmagens konnte mit der Filtrationsmethode ein radioaktives, alkali-unlösliches Material im Filter zurückgehalten werden; es mußte jedoch noch nachgewiesen werden, daß es sich dabei um Chitin handelt. Zum Nachweis von Chitin sind mehrere Methoden üblich, die auf dem Abbau dieses Polysaccharids durch Chitinase bzw. Salzsäure beruhen. Zunächst wurden mehrere Proben wie gewöhnlich inkubiert, die Inkubation mit 50%iger KOH gestoppt und die Proben zwei Stunden bei 100°C erhitzt. Nach der Filtration durch Milliporefilter wurden einige Filter direkt in Szintillationsflüssigkeit überführt, um die Radioaktivität zu messen. Andere Filter wurden in Puffer (0,15 M Zitronensäure - 0,3 M Dinatriumhydrogenphosphat), der 2 mg Chitinase enthielt, bei 37° für 12 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Filter, die mit hitzedenaturierter Chitinase bzw. Puffer behandelt wurden. Die Reaktion wurde mit 50%iger KOH gestoppt. Danach wurde jede Probe, das Filter eingeschlossen, in eine Nutsche gebracht, die Flüssigkeit durch ein neues Milliporefilter abgesaugt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Radioaktivität wurde in beiden Filtern bestimmt, um zu sehen wieviel markiertes Material durch die Behandlung aus dem Filter entfernt wurde.

In weiteren Ansätzen wurde das gebildete Material auf den Filtern mit 6 M HCl bei 100°C für 8 - 10

Stunden hydrolysiert und die aus den Filtern freigesetzte Radioaktivität bestimmt. Als Kontrolle diente hier ein Filter, welches in Wasser inkubiert wurde.
Daneben wurden einige Proben mit Trypsin (5 mg/ ml in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,5) ebenfalls bei 37°C für etwa 6 Stunden inkubiert.

Für die Papierchromatographie wurden die Proben nach Behandlung mit KOH 20 Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert und die in Alkali unlöslichen Pellets mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in je 1 ml Lösung suspendiert, die 2 mg Chitinase und 2 mg ß-Glukosidase in 0,15 M Zitronensäure - 0,3 M Dinatriumhydrogenphosphat - Puffer enthielt, und für 12 Stunden bei 37°C im Schüttelthermostaten inkubiert. Die Inkubation wurde durch Erhitzen der Proben im kochenden Wasserbad beendet; nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände gefriergetrocknet. Nachdem die Lyophilisate in jeweils 50 µl Wasser aufgenommen worden waren, wurden sie auf Whatman 3 MM Chromatographiepapier mit n - Butanol : Eisessig : Wasser (4 : 1 : 5) als Laufmittel aufgetrennt. Als Vergleichssubstanz diente N - Acetylglukosamin. Es wurde nach Trocknung der Chromatogramme mit dem Nachweis nach Morgan - Elson (Stahl, 1967) sichtbar gemacht. Die Bahnen des Chromatogramms mit den radioaktiv markierten Proben wurden in 1 cm breite Streifen zerschnitten und anschließend die Radioaktivität jedes Streifens im Szintillationszähler bestimmt; als Szintillationsflüssig-

keit wurde hierbei Quickszint 294 verwendet. Zur Kontrolle wurden Proben mit hitzedenaturierter Chitinase/ ß-Glukosidase - Lösung bzw. Puffer inkubiert und danach wie beschrieben weiterbehandelt.

13. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Fixierung von Teilen des Muskelmagens wurde in 2,5% bzw. 5% Glutaraldehyd in 0,1 M bzw. 0,05 M Cacodylatpuffer (pH 7,3) vorgenommen. Für Pellets der Differentialzentrifugation wurden 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer verwendet. Die Nachfixierung erfolgte in 1% Osmiumtetroxid in 0,05 bzw. 0,1 M Cacodylatpuffer. Nach der Entwässerung über eine Alkoholreihe wurden die Proben in Araldit eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Reichert OM U 3 Ultramikrotom angefertigt und mit Bleizitrat (Reynolds, 1963) nachkontrastiert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Schnitte wurde an einem Zeiss EM 9S bzw. einem Philips EM 300 durchgeführt.

Überstände der Differentialzentrifugation wurden nach Negativkontrastierung untersucht. Die Proben wurden auf mit Formvar befilmte und mit Kohle bedampfte Netze gebracht, mit Tris/HCl - Puffer (s. Präparation) gewaschen und mit 1%iger wässriger Uranylacetatlösung oder 1%iger Phosphorwolframsäure mit 0,01% Albumin kontrastiert (Huxley, 1963).

14. Bestimmung der Protease- und Amylaseaktivität

Die Proteaseaktivität wurde in folgenden Proben von Muskelmagenpräparationen bestimmt: in wässrigen Extrakten von Mageninhalt und Kutikulae sowie in Epithel- und Muskelhomogenaten, die durch Zentrifugation mit einer Eppendorf Laborzentrifuge (10 000 x g) in Pellets und Überstände aufgetrennt worden waren. Es wurden unterschiedliche Mengen der Proben in einem Endvolumen von 500 µl mit 50 mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 - Puffer (pH 7,5) und als Substrat 0,6% Azokasein inkubiert. Die Inkubation dauerte 15 Minuten bei 37°C und wurde durch Zugabe von 500 µl 50%iger Trichloressigsäure beendet. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 10 000 x g wurde die Extinktion der Probenüberstände bei 366 nm bestimmt.

Zur Bestimmung der Amylaseaktivität wurde die Mikromethode des Merckotest α-Amylase verwendet. Der Test wurde in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) bei 37°C durchgeführt; als Substrat diente 0,02%ige Amyloslösung. Die Reaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten durch 0,008 N Jodlösung gestoppt und nach weiteren 5 Minuten die Extinktion der Proben bei 620 nm gemessen. Die Amylaseaktivität wurde in Proben bestimmt, die wie im vorhergehenden Absatz beschrieben hergestellt wurden. In den Pellets wurde wegen der Trübung der Lösung keine Aktivitätsbestimmung durchgeführt.

C. Ergebnisse

1. Der Bau des Muskelmagens

Der Verdauungstrakt des Regenwurms Lumbricus terrestris ist in Pharynx, Ösophagus, Kropf, Muskelmagen, Mittel- und Enddarm gegliedert (Abb. 2a). Chitin wurde in der Kutikula von Kropf und Muskelmagen (Abb. 2b) und in den vom Darmepithel abgeschiedenen peritrophischen Membranen nachgewiesen (Peters, 1968; Vierhaus, 1971). Der Muskelmagen erstreckt sich bei Lumbricus terrestris vom 17. bis etwa 19. Segment. Er schließt an den Kropf an und mündet in den Darm.

Der Muskelmagen zeichnet sich durch die stark entwickelte Ring- und Längsmuskulatur aus, die vom Epithel durch eine schon lichtmikroskopisch erkennbare, dicke Basalmembran getrennt wird (Abb. 2c). Im Elektronenmikroskop läßt sich diese Basalmembran in zwei Zonen auflösen: eine etwa 50 nm dicke aus filamentösem Material bestehende Grenzlamelle der Zellen (= Basalmembran im eigentlichen Sinn) und eine etwa 3 µm dicke kollagenhaltige Schicht (Abb. 3d).

Die etwa 50 µm hohen Zellen des einschichtigen Epithels sind seitlich stark miteinander verzahnt und haben einen Durchmesser von etwa 8 µm. Zum Lumen des Muskelmagens hin besitzen sie einen Mikrovillisaum (ca. 5 µm hoch; Abb. 3a u. e) Die 4-7 µm großen Kerne sind zum überwiegenden Teil etwas unterhalb der

Zellmitte angeordnet. Im apikalen Teil der Zellen ist eine große Anzahl von Mitochondrien (0,4 - 0,8 µm) erkennbar (Abb. 3e). Ferner finden sich in den Zellen granuläre Strukturen, bei denen es sich offenbar um Ribosomen und Glykogengranula handelt (Abb. 3c und e). Auffallend sind die vielen Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, welche die Zellen durchziehen. Daneben findet sich eine große Zahl Vesikel (35 - 350 nm Ø), von denen ein großer Teil sehr elektronendicht ist (Abb. 3c und e). Erst bei stärkerer Vergrößerung werden Golgi-Apparate und offenbar von ihnen gebildete Vesikel erkennbar (Abb. 3c). Etwa 0,7 bis 1,1 µm starke Nervenbündel (Abb. 3e) werden häufig an der Basis der Epithelzellen angetroffen.

2. Die sogenannte Kutikula des Muskelmagens

An der Lumenseite weist der Muskelmagen eine verschieden starke sogenannte Kutikula*) auf. Sie wird vom Epithel des Magens abgeschieden; das in ihr nachweisbare Chitin ist in Form von chitinhaltigen Mikrofibrillen in eine protein- und mucopolysaccharidhaltige Matrix eingelagert. Die Maskierung der Mikrofibrillen durch diese Matrix hat zur Folge, daß im Elektronenmikroskop keinerlei Texturen oder andere Strukturen in ihr erkennbar sind. Erst eine Behandlung mit KOH, welche Proteine und Mucopoly-

*) Der Begriff Kutikula beschreibt ganz allgemein eine Struktur, die eine Schutzfunktion hat. So ist der Kutikula von Insekten und der hier beschriebenen Struktur lediglich das Vorhandensein von Chitin gemeinsam.

saccharide entfernt, ermöglicht es, die Mikrofibrillen sichtbar zu machen (Peters, 1968b; Vierhaus, 1971). Nach Bedampfung mit Platin wird erkennbar, daß die Mikrofibrillen in einer Streuungstextur vorliegen (Vierhaus, 1971).

Da keine quantitativen Angaben über die Inhaltsstoffe der Kutikula vorlagen, wurde versucht, an Extrakten der Kutikula den Gehalt an Proteinen und Mucopolysacchariden sowie an extrahierten Kutikulae den Chitingehalt zu bestimmen. Das mit SDS/Harnstoff aus der Kutikula extrahierte Protein entspricht 44,9% $\pm$ 7,1% des Trockengewichts einer Kutikula. Die Bestimmung von Protein im NaOH - Extrakt ergab äußerst niedrige Werte im Bereich der Nachweisgrenze bzw. war negativ; es wurde daher davon ausgegangen, daß sich der Hauptanteil des Proteins im SDS/Harnstoff - Extrakt befindet. Der Versuch, eine quantitative Uronsäurebestimmung in den Extrakten durchzuführen, brachte keine verwertbaren Ergebnisse, obwohl die Extrakte vother 24 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert wurden, um eine Beeinflussung des Carbazoltests durch die Extraktionsmedien auszuschließen. Die Anwendung des Carbazoltests auf extrahierte und unbehandelte Kutikulae zeigt aber deutlich, daß Uronsäuren und folglich Mucopolysaccharide vorhanden sind. Die unbehandelte Kutikula zeigt ein deutliches Absorptionsmaximum bei 530 nm, das charakteristisch für Uronsäuren ist; die mit SDS/Harnstoff bzw. 1 M NaOH extrahierten Proben weisen dagegen in ihrer Absorptionskurve an dieser Stelle nur noch einen schwachen Anstieg auf (Abb. 4).

Extrahierte Kutikulae wurden durch Chitinase vollständig abgebaut. Der über das freigewordene N - Acetylglukosamin bestimmte Chitinanteil einer Kutikula beträgt 28,7% ± 5,7%.

3. Umsatz von ^{14}C - Glukose in vivo

Die zunächst durchgeführten Versuche mit ^{14}C - Glukose sollten erstens zeigen, ob tatsächlich kontinuierlich Chitin vom Epithel des Muskelmagens synthetisiert wird, und zweitens beweisen, daß es sich bei der auf Autoradiographien des Magens erkennbaren Bande um radioaktiv markiertes Chitin handelt. Die Messung der im Chitin vorhandenen Radioaktivität zeigt, daß schon 10 Minuten (dieser Wert ist in der Kurve nicht eingetragen) nach der Injektion von ^{14}C - Glukose ein Einbau radioaktiven Materials in die Kutikula erfolgt ist. Trotz der Schwankungen der Meßwerte ist erkennbar, daß bis 24 Stunden nach der Injektion ein ständiger Anstieg der Radioaktivität im Chitin erfolgt. Danach ändert sich die Höhe der Radioaktivität nur noch wenig, um nach 56 Stunden deutlich abzunehmen. Von der ursprünglich dem Wurm injizierten Radioaktivität findet man in der Kutikula des Muskelmagens relativ wenig wieder; maximal wurden 2% gemessen. Dieser Anteil ist im NaOH - Extrakt der Kutikula noch geringer; hier waren nur 0,2% der eingesetzten Radioaktivität nachweisbar. Über einen Zeitraum von 65 Stunden betrachtet, steigt die Radioaktivität hier kontinuierlich an, um nach 56 Stunden ebenfalls stark abzunehmen.

4. Chitinsynthetaseaktivität

4.1 Identifizierung des Reaktionsproduktes

Nachdem die Inkubation von Muskelmägen und Epithelhomogenaten mit UDP - ^{14}C - GlcNAc zur Bildung eines alkali-unlöslichen Materials geführt hatten, kam es zunächst darauf an nachzuweisen, daß es sich bei diesem Reaktionsprodukt um Chitin handelt.

In mehreren Versuchen konnten durch Chitinase 80 - 85% der im Filter befindlichen Radioaktivität freigesetzt werden. Die Kontrollen mit Zitronensäure - Phosphatpuffer bzw. hitzedenaturierter Chitinase waren dagegen negativ. Auch Versuche, das Reaktionsprodukt mit Hilfe von Trypsin abzubauen, führten zu keiner Freisetzung von Radioaktivität; damit ließ sich die Möglichkeit ausschließen, daß während der Inkubation ein Protein bzw. Glykoprotein gebildet wird.

Zur Absicherung des Ergebnisses der Chitinasebehandlung wurden Filter mit dem alkali-unlöslichen Reaktionsprokukt mit 6 M HCl inkubiert. Durch die Salzsäurebehandlung konnten annähernd 90% der Radioaktivität aus den Filtern entfernt werden. Bei den in destilliertem Wasser inkubierten Kontrollen hingegen verbleib die Radioaktivität nahezu vollständig im Filter.

Die papierchromatographische Auftrennung der mit Chitinase und Glukosidase behandelten Proben zeigte, daß der Hauptanteil der Radioaktivität zusammen mit

N - Acetylglukosamin lief, während in der Kontrolle an der Stelle des Aminozuckers keine Radioaktivität feststellbar war.

Es konnte somit durch alle drei Methoden gezeigt werden, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt der Inkubationen um Chitin handelt.

4.2. Aktivität der Synthetase in ganzen Muskelmägen

Die Inkubation ganzer Muskelmägen wurde sowohl mit ^{14}C - Glukose als auch mit UDP - ^{14}C - GlcNAc als Substrat durchgeführt. Bei beiden Substraten wurde zunächst nur ein niedriger Einbau in ein alkali-unlösliches Material festgestellt. Der Umsatz war mit 0,07 nM/20 mg Muskelmagen für Glukose und 0,073 nM/20 mg für UDP - GlcNAc nach einer Inkubation von 30 Minuten in beiden Fällen nahezu identisch.

In weiteren Experimenten wurde versucht, einen höheren Umsatz der Substrate zu erreichen, indem die Muskelmägen in Gegenwart von 0,5% Triton X-100 inkubiert wurden. Das Detergens sollte den Eintritt von UDP - GlcNAc in die Epithelzellen erleichtern, da dieser phosphorylierte Aminozucker Membranen anscheinend nicht ohne weiteres passieren kann (Surholt und Zebe, 1972). Diese Maßnahme führte zu einem deutlichen Unterschied im Einbau von Glukose und UDP - GlcNAc. Der Einbau des indirekten Substrats Glukose blieb nahezu unverändert; es wurden nach 30 Minuten 0,1 nM/20 mg Muskelmagen umgesetztes Substrat gemessen. Die Inkubation mit dem direkten Substrat der Chitinsynthetase, UDP - GlcNAc, dagegen führte

zu einer Steigerung des Einbaus in Chitin, nämlich auf 0,4 nM/20 mg.

In Abb. 6 ist die Wirkung von 0,5% Triton X-100 auf die Aktivität der Chitinsynthetase in ganzen Muskelmägen in Gegenwart des Substrats UDP - GlcNAc dargestellt. Bei der Inkubation von Muskelmägen ohne das Detergens ist bis 60 Minuten eine lineare Abhängigkeit zwischen Substratumsatz und Inkubationszeit zu beobachten. Die Inkubation mit Triton X-100 führt zwar zu einer Aktivitätssteigerung, bewirkt aber gleichzeitig den Verlust der linearen Abhängigkeit zwischen Substratumsatz und Inkubationszeit.

4.3 Inkubation von Epithelhomogenaten

Die Ergebnisse der Versuche mit ganzen Muskelmägen ließen zunächst vermuten, daß die Wirkung von Triton X-100 darin besteht, dem Substrat UDP - GlcNAc den Zugang in die Epithelzellen zu erleichtern. Ein ähnlicher Effekt wäre dann ebenfalls durch rein mechanisches Aufbrechen der Zellen zu erwarten. Aus diesem Grund wurden die Epithelien von der Muskulatur getrennt und aus ihnen hergestellte Homogenate mit UDP - ^{14}C - GlcNAc inkubiert.

4.3.1 Aktivitätserhöhung durch Detergentien

Die Inkubation der Epithelhomogenate führte zu einem niedrigen Substratumsatz wie die Inkubation ganzer Muskelmägen in Abwesenheit von Triton X-100.

Inkubationen in Gegenwart von Triton X-100 zeigten, daß auch im Homogenat eine Aktivitätssteigerung durch das Detergens bewirkt wird. In Abb. 7 ist der Effekt unterschiedlicher Tritonkonzentrationen als relative Aktivität dargestellt. Der höchste Einbau von UDP - ^{14}C - GlcNAc wurde bei einer Konzentration von 0,1% Triton X-100 gemessen. Höhere Tritonkonzentrationen scheinen die Chitinsynthetase zu hemmen; bei 1% Triton X-100 ist die im Filter nachweisbare Radioaktivität auf einen Wert abgesunken, der ungefähr dem der Proben ohne Tritonbehandlung entspricht.

Einige Homogenate wurden anstatt mit 0,2% Triton X-100 mit Digitonin (10 mg/ml) hergestellt. Digitonin hat eine dem Detergens vergleichbare Wirkung auf Membranen. Die Radioaktivitätsmessungen zeigten, daß Digitonin in der verwendeten Konzentration zu vergleichbaren Ergebnissen wie Triton X-100 führte.

Die Inkubation unterschiedlicher Mengen Homogenat in Gegenwart von 0,1% Triton X-100 führte zu dem in Abb. 8 dargestellten Ergebnis. Wie die Kurve zeigt, besteht im untersuchten Bereich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Aktivität des Enzyms und der Proteinmenge. Ein annähernd linearer Anstieg des Substratumsatzes konnte während Inkubationen bis 90 Minuten Dauer nur während der ersten 30 Minuten beobachtet werden; danach flacht die Kurve stark ab (Abb. 9). Alle weiteren Versuche wurden daher nach 30 Minuten beendet. Durch Inkubation des Epithelhomogenates in Gegenwart unterschiedlicher Substratkonzentrationen konnte unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine Michaelis-Konstante von K_m=1,09 mM/dm^3

bestimmt werden (Abb. 10).

4.3.2 Aktivierungsversuche mit Proteasen

Das unbehandelte Epithelhomogenat zeigte nur eine sehr geringe Enzymaktivität, die durch Triton X-100 stark erhöht werden konnte. Aus den Untersuchungen an verschiedenen Pilzen ist bekannt, daß eine Aktivierung der Chitinsynthetase, die bei diesen Objekten zum großen Teil in einen inaktiven Zustand vorliegt, mittels Proteasen möglich ist (Cabib und Farkas, 1971; Ruiz-Herrera und Bartnicki-Garcia, 1974). Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob eine entsprechende Aktivierung beim Enzym des Regenwurms ebenfalls möglich ist.Dazu wurden gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen unbehandelte Homogenate und solche mit 0,1% Triton X-100, neutraler Protease (60 µg/ml; Bacillus subtilis), Trypsin (5 µg/ml) bzw. dem Proteaseinhibitor Trasylol (4000 U/ml; Bayer) inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 11 in relativen Aktivitäten dargestellt; obgleich die Proteasen in Konzentrationen verwendet wurden, die bei Pilzpräparationen eine gute Wirkung erzielten, konnte die durch Triton X-100 bewirkte Aktivitätserhöhung nicht erreicht werden. Zusammen mit dem Detergens bewirkten die Proteasen eine Steigerung der Aktivität auf das 23 - fache des unbehandelten Homogenats. In Gegenwart von Triton, Protease und Trasylol wurde eine weitere Erhöhung der Aktivität beobachtet. Die weitem höchste relative Aktivität wurde jedoch in mit Triton X-100 behandelten Epithelhomogenaten gemessen, die neben dem Detergens noch Trasylol enthielten.

Durch vergleichende Untersuchungen an verschiedenen chitinsynthetisierenden Pilzen konnte gezeigt werden, daß die Chitinsynthetase je nach Herkunft nur durch die eine oder andere Protease optimal aktivierbar ist (Bartnicki-Garcia et al., 1978). Die beste Wirkung könnte daher von einer körpereigenen Protease erwartet werden. Da im Muskelmagen sowie seiner Kutikula eine Protease nachweisbar ist, wurde die Kutikula als Enzymquelle für den folgenden Versuch benutzt.

Für die Aktivierungsversuche mit Kutikulaextrakt wurden die Fraktionen eines durch Differentialzentrifugation aufgetrennten Epithelhomogenats verwendet. Jede Probe wurde in einem Endvolumen von 200 µl mit je 20 µl Kutikulaextrakt (1,3 mg Protein/ml) inkubiert; alle anderen Bedingungen entsprachen einer normalen Inkubation. Um eine Chitinsynthetaseaktivität im Kutikulaextrakt auszuschließen, wurde auch dieser allein inkubiert; die nach der Inkubation im Filter meßbare Radioaktivität lag allerdings im Bereich der Blindwerte. Die Wirkung des Extrakts auf die Fraktionen des Homogenats ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Während im 6200 x g - Pellet keine Aktivitätserhöhung feststellbar ist, wurden in den beiden Fraktionen des 100 000 x g - Zentrifugationsschrittes verglichen mit den Proben ohne Kutikulaextrakt 1,4 bzw. 1,3 - fach erhöhte Aktivitäten gemessen.

Tabelle 1

Wirkung von Proteasen des Kutikulaextraktes auf die Chitinsynthetase im fraktionierten Epithelhomogenat. Die Inkubation erfolgte in Gegenwart von 0,1% Triton X-100 und eines wässrigen Extraktes der Kutikula.

Fraktion		spezifische Aktivität (cpm/ mg Protein)		Aktivierung
		- Kutikula-extrakt	+ Kutikula-extrakt	
P	6 200 xg	2109	2197	1,0 x
P	100 000 xg	3245	4500	1,4 x
Ü	100 000 xg	185	245	1,3 x

4.3.3 Der Einfluß von N - Acetylglukosamin

Dem Grundbaustein des Chitins, N - Acetylglukosamin, wird wegen seiner Wirkung auf die Aktivität der Chitinsynthetase verschiedener Pilze die Rolle eines allosterischen Aktivators zugeschrieben (de Rousset-Hall und Gooday, 1975; Ruiz-Herrera et al., 1977). Durch Inkubation des Epithelhomogenats in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Aminozuckers sollte

geprüft werden, ob eine solche Beeinflussung auch bei der Chitinsynthetase des Regenwurms zu beobachten ist.

Zunächst war es aber notwendig festzustellen, ob und in welcher Konzentration GlcNAc im Homogenat nachweisbar ist. Die quantitative Bestimmung endogenen N - Acetylglukosamins erfolgte nach der Methode von Reissig et al. (1955). Mehrere Messungen ergaben eine Konzentration des Aminozuckers von etwa 4 nM/ml; das entspricht einer 4 µmolaren Lösung. Da die niedrigste während der Inkubation eingesetzte Menge GlcNAc um den Faktor 500 höher war als die Konzentration des endogenen Aminozuckers, konnte der im Homogenat vorhandene Zucker vernachlässigt werden. Die Inkubation wurde mit GlcNAc - Konzentrationen von 2 bis 100 mM durchgeführt. Mit steigender Konzentration des Aminozuckers ist ein geringer Anstieg der Aktivität zu beobachten (Tabelle 2). Verglichen mit der Wirksamkeit von GlcNAc auf die Chitinsynthetase verschiedener Pilze ist der Einfluß auf das Enzym des Regenwurms äußerst schwach.

Tabelle 2

Einfluß von N - Acetylglukosamin auf die Aktivität der Chitinsynthetase im Epithelhomogenat. Es sind die Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen angegeben.

GlcNAc (mM)	spezifische Aktivität (cpm/mg Protein)	relative Aktivität
--	4085	1,00
2	4646	1,13
5	4572	1,12
10	4990	1,22
20	5095	1,24
40	5222	1,27
100	6318	1,54

4.3.4 Hemmung durch Uridindiphosphat

Das Nukleotid Uridindiphosphat wird beim Einbau von UDP - GlcNAc in Chitin durch die Chitinsynthetase frei. Bei Pilzen wurde festgestellt, daß UDP neben anderen weniger effektiven Nukleotiden ein starker Inhibitor der Chitinsynthetase ist (Keller und Cabib, 1971; McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971; Jan, 1974; de Rousset-Hall und Gooday, 1975). Im Zusammenhang mit der Regulation der Chitinsynthese beim Regenwurm erschien die Wirkung des Nukleotids auf die Chitinsynthetase besonders wichtig.

Erste Versuche mit UDP führten zu einer starken Hemmung der Chitinsynthetase; die Inhibierung betrug bei einer Konzentration von 1 mM UDP nahezu 100%. Da mit einem Homogenat gearbeitet wurde, welches mit großer Wahrscheinlichkeit schon UDP enthielt, mußte die Konzentration des endogenen Nukleotids bestimmt werden; vor allem war wichtig zu wissen, ob die UDP - Konzentrationen so hoch lagen, daß sie bei der Berechnung der Gesamtkonzentration berücksichtigt werden müßten. Die UDP - Bestimmung erfolgte nach der Methode von Leloir und Goldemberg (1960). Die Messungen an den Epithelhomogenaten mehrerer Präparationen ergaben eine mittlere UDP - Konzentration von 0,16 mM.

In Abb. 12 ist die Inhibierung des Regenwurmenzyms durch steigende Mengen UDP beschrieben. Die Konzentrationsangaben stellen die Summe aus endogenem und exogenem UDP dar. Bei 0,2 mM UDP erreicht die Hemmung 25%; 0,5 mM UDP hemmten 80%, und bei 1 mM UDP wird

mit annähernd 100% der gleiche Wert wie in den Vorversuchen erreicht.

In weiteren Versuchen wurde angestrebt, die Wirkung des endogenen UDP zu verringern bzw. aufzuheben. Hierzu wurden Proben mit unterschiedlichen Mengen Pyruvatkinase (PK) und Phosphoenolpyruvat (PEP) inkubiert. Die Pyruvatkinase wurde in destilliertem Wasser verdünnt eingesetzt, da das für den Reaktionsablauf notwendige Mg^{2+} schon in den Proben vorhanden war. Phosphoenolpyruvat wurde in 200 mM KCl gelöst. Die Konzentration von PEP betrug bei allen in Abb. 13 dargestellten Werten 0,125 mM. Mit Hilfe von 4 µg PK in 200 µl Probevolumen konnte die Aktivität der Chitinsynthetase verdoppelt werden. In Abhängigkeit von der Inkubationsdauer verläuft die Kurve wie jene der Proben, die ohne PK und PEP inkubiert wurden. Durch Erhöhung der Konzentration von PEP auf 0,25 in Gegenwart von 4 µg PK/ 200 µl war eine weitere, allerdings nicht so hohe, Aktivitätssteigerung auf insgesamt etwa 250% erreichbar.

4.3.5 Die Wirkung von Inhibitoren der Chitinsynthese

Polyoxine sind Antibiotika, die von dem Pilz Streptomyces cacaoi var. asoensis produziert werden. Sie werden als Fungizide verwendet. Bei einer Reihe von Pilzarten ist nachgewiesen, daß Polyoxine ihre Chitinsynthese hemmen; sie wirken dabei direkt auf die Chitinsynthetase. Die Hemmung ist kompetitiv und spezifisch (Endo et al., 1970); sie ist auf

die große Ähnlichkeit des Polyoxin- und des Substratmoleküls (s. Abb. 14) zurückzuführen. Wegen der Spezifität der Inhibitorwirkung kann eine Abnahme der Enzymaktivität in Gegenwart des Antibiotikums als Beweis für das Vorhandensein einer aktiven Chitinsynthetase gelten.

Vom Polyoxin existieren eine Reihe Variationen, die sich durch drei Endgruppen unterscheiden (Isono et al., 1969); das bei Untersuchungen der Chitinsynthetase meistbenutzte ist Polyoxin D (Abb. 14). Diese Form des Antibiotikums wurde auch bei den hier beschriebenen Hemmversuchen verwendet.

Die ersten Versuche mit Polyoxin D wurden an Epithelhomogenaten durchgeführt, die in Puffer hergestellt wurden, der 3 mM EDTA als Komplexbildner enthielt. Die Substratkonzentration während der Inkubation betrug 0,5 mM UDP - GlcNAc. Eine Polyoxinkonzentration von 5 µg/ ml führte zu einer Hemmung der Chitinsynthetase von etwa 35%. Die Hemmung steigt über 60% bei 10 µg/ ml auf 70% bei 25 µg/ ml und erreicht bei einer Inhibitorkonzentration von 50 µg/ ml einen Wert von 90%. Dieser Wert wird auch durch weitere Steigerung der Polyoxinkonzentration auf 100 µg/ ml nur geringfügig erhöht (Abb. 15).

Durch Erhöhung der Substratkonzentration konnte die inhibierende Wirkung von Polyoxin D aufgehoben oder verringert werden. So hemmten 10 µg/ ml des Inhibitors bei einer Substratkonzentration von 2 mM UDP - GlcNAc nicht; bei 100 µg/ ml sank die Hemmung in Gegenwart von 4 mM Substrat auf 60%.

Bei den Versuchen zum Einfluß von Komplexbildnern auf die Aktivität der Chitinsynthetase des Regenwurms (s. Seite 38) hatte sich gezeigt, daß durch Äthylenglykol - bis (2 - aminoäthyläther) - N, N - tetraessigsäure (EGTA) eine Aktivitätssteigerung gegenüber Proben mit EDTA erzielt werden kann. Es wurden nun auch Hemmversuche mit EGTA - haltigen Homogenaten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigten jedoch bei keiner Polyoxinkonzentration eine höhere Hemmung als etwa 4%, da EGTA anscheinend die Hemmbarkeit des Enzyms stark herabsetzt (Abb. 15).

Ein weiterer Inhibitor der Chitinsynthese ist das Insektizid Dimilin (TH 6040, Diflubenzuron). Während Polyoxin D die Chitinsynthetase sowohl bei Insekten als auch bei Pilzen inhibiert (van Eck, 1978), ist Dimilin bei Pilzen wirkungslos. Über die Wirkung des Insektizids ist bisher keine endgültige Aussage möglich; es wird vermutet, daß der Aktivator der Chitinsynthetase der Wirkungsort ist (Marks und Leighton, 1980).

Die Wirkung von Dimilin auf das Enzym des Regenwurms erschien aus zwei Gründen interessant. Erstens lassen die Aktivierungsversuche mit Proteasen vermuten, daß die Chitinsynthetase im Epithelhomogenat schon überwiegend im aktiven Zustand vorliegt; wenn der Inhibitor tatsächlich auf die aktivierende Protease wirkt, müßte das Insektizid bei der Chitinsynthetase des Regenwurms wirkungslos sein. Zweitens wird das Insektizid schon in Freilandversuchen er-

probt. Da hierbei Dimilin auch auf und in den Boden gelangt, erschien es wichtig zu wissen, ob die Chitinsynthese des Regenwurms durch das Schädlingsbekämpfungsmittel beeinflußt wird.

Die Epithelhomogenate wurden mit Dimilin in Konzentrationen von 10 bis 200 nM inkubiert. Die Bildung von radioaktivem, alkali-unlöslichen Material nahm bei den niedrigen Konzentrationen (10 und 20 nM) ab, blieb dann aber bei allen folgenden Konzentrationserhöhungen konstant bei dem einmal erreichten Wert von 85% der Ausgangsaktivität (Abb. 16).

4.3.6 Der Einfluß von Komplexbildnern und zweiwertigen Metallionen

Aus allen bisher durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung der Chitinsynthetase - gleichgültig ob es sich um Enzym aus Pilzen oder Tieren handelte - ist ersichtlich, daß die Aktivität der Synthetase durch Mg^{2+} - Ionen erhöht und durch Ca^{2+} - Ionen erniedrigt werden kann. Für die folgenden Versuche wurden Epithelhomogenate verwendet, die in Tris/HCl - Puffer, der weder einen Komplexbildner noch zweiwertige Metallionen enthielt, hergestellt wurden. Vor der Inkubation der Proben wurden unterschiedliche Mengen EDTA bzw. EGTA, $MgCl_2$ bzw. $CaCl_2$ oder Komplexbildner und Metallionen kombiniert zu den Inkubationslösungen gegeben.

Die Aktivitäten der Chitinsynthetase unter den beschriebenen Bedingungen ist in Tabelle 3 aufgelistet. Zum besseren Vergleich sind relative Aktivitäten angegeben; als Bezugspunkt mit einer relativen Aktivität gleich 1,0 dient wie in anderen Versuchen das ohne weitere Zusätze inkubierte Homogenat. Obwohl die Ergebnisse der einzelnen Präparationen bei diesen Versuchen zahlenmäßig stark schwanken, sind die nachfolgend beschriebenen Tendenzen im Verhalten des Regenwurmenzyms deutlich erkennbar.

Das vergleichsweise unspezifische EDTA erniedrigt die Aktivität bei allen verwendeten Konzentrationen (0,5; 1 und 3 mM), während das spezifischere EGTA - es bindet in erster Linie Ca^{2+}- Ionen - erst ab 3,0 mM eine deutliche Senkung der Aktivität bewirkt. Bei gleichzeitiger Zugabe der Komplexbildner und 10 mM $MgCl_2$ erfolgt eine starke Aktivitätserhöhung; im Falle von EDTA fällt allerdings auf, daß die Aktivität mit steigender Aktivität des Komplexbildners wieder abnimmt. Die Ergebnisse aller drei Präparationen lassen EGTA als den geeigneteren Chelatbildner erscheinen, da es in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ in jedem Fall eine höhere Aktivitätssteigerung als EDTA bewirkt; im Gegensatz zum EDTA sinkt die Aktivität auch nicht mit steigender Konzentration des Komplexbildners. Wie die Chitinsynthetase anderer Untersuchungsobjekte wird auch das Enzym des Regenwurms gehemmt, wenn Homogenate in Gegenwart von 5 - 10 mM $CaCl_2$ inkubiert wurden.

Tabelle 3

Wirkung von Komplexbildnern und zweiwertigen Metallionen auf die Aktivität der Chitinsynthetase des Regenwurms.

Zusatz	spezifische Aktivität (cpm/mg Protein)	relative Aktivität
Präparation 1		
- - - -	303	1,0
3 mM EDTA 10 mM $MgCl_2$	5095	15,0
3 mM EGTA 10 mM $MgCl_2$	8528	25,0
Präparation 2		
- - - -	881	1,0
3 mM EDTA	- - - -	---
3 mM EGTA	702	0,8
3 mM EDTA 10 mM $MgCl_2$	3932	4,5
3 mM EGTA 10 mM $MgCl_2$	5520	6,2

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Zusatz	spezifische Aktivität (cpm/mg Protein)	relative Aktivität
Präparation 3		
- - - -	340	1,0
0,5 mM EDTA	85	0,25
1,0 mM EDTA	----	----
3,0 mM EDTA	----	----
0,5 mM EGTA	394	1,2
1,0 mM EGTA	305	0,9
3,0 mM EGTA	150	0,45
0,5 mM EDTA 10 mM $MgCl_2$	3162	9,4
1,0 mM EDTA 10 mM $MgCl_2$	2949	8,7
3,0 mM EDTA 10 mM $MgCl_2$	2760	8,2
0,5 mM EGTA 10 mM $MgCl_2$	3553	10,5
1,0 mM EGTA 10 mM $MgCl_2$	3775	11,2
3,0 mM EGTA 10 mM $MgCl_2$	3782	11,2
5 mM $CaCl_2$	85	0,25
10 mM $CaCl_2$	72	0,21
3,0 mM EGTA 5,0 mM $CaCl_2$	455	1,4

4.3.7 Ergebnisse der Differentialzentrifugation

Das Ziel der bisher beschriebenen Versuche war es vor allem, die Eignung des Regenwurms als Untersuchungsobjekt der tierischen Chitinsynthetase zu testen und eine vorläufige Charakterisierung des Enzyms vorzunehmen. Durch Herstellung von Fraktionen des Epithelhomogenats mit Hilfe der Differentialzentrifugation sollten Anhaltspunkte für eine Lokalisation des Regenwurmenzyms gewonnen und die spezifische Aktivität des Enzyms in den Proben erhöht werden. Die Proben wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert wie Epithelhomogenate. Gleichzeitig wurden Schnitte der Pellets und negativ kontrastierte Proben des Überstandes im Elektronenmikroskop untersucht. Die nach der Zentrifugation fixierten Proben wurden nicht wie zur Inkubation mit 0,1% Triton x-100 behandelt.

Die Messung umgesetzten Substrats zeigt, daß sich im 6200 x g - Pellet annähernd 70% der Gesamtaktivität befinden (Tabelle 4). Diese Fraktion des Epithelhomogenats enthielt Kerne, Mitochondrien, Organellbruchstücke, Membranteile sowie Teile der Basalmembran und Reste der noch am Epithel verbliebenen Muskulatur (Abb. 17).

In der Mikrosomenfraktion (100 000 x g - Pellet) sind dagegen nur etwa 27% der Gesamtaktivität enthalten; allerdings ist die spezifische Aktivität die höchste aller Fraktionen. Auf Schnitten dieses Pellets sind im Elektronenmikroskop hauptsächlich Ribosomen, Vesikel und Membranfragmente erkennbar (Abb. 18).

Mit nur wenig über 4% der Gesamtaktivität ist der Enzymgehalt des Überstandes (100 000 x g) am geringsten. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Überstandes wurden außer einem Proteinfilm, der das gesamte Netz überzog und an einigen Stellen stärker kontrastiert erschien, keine weiteren Strukturen sichtbar. Da infolge der Negativkontrastierung keine quantitative Aussage über die Zusammensetzung des Überstandes möglich ist (die Netze werden mehrfach mit Puffer abgespült und die in der Probe vorhandenen Substanzen und Partikel haften unterschiedlich gut auf den befilmten Netzen), kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich auch im Überstand noch wenige Ribosomen und kleinste Membranteilchen befinden.

Bei dem Pilz Coprinus cinereus konnte die Chitinsynthetase durch Behandlung des Mikrosomenpellets mit Digitonin (10 mg/ ml) in den Überstand gebracht werden (Gooday und de Rousset-Hall, 1975). Die Auftrennung eines in Gegenwart dieser Digitoninmenge hergestellten Epithelhomogenats durch Differentialzentrifugation führte jedoch zu keiner Anreicherung der Chitinsynthetase des Regenwurms im Überstand. Obgleich der erste Zentrifugationsschritt bei etwa 4000 x g und die Auftrennung des daraus resultierenden Pellets bei 25 000 x g erfolgte, konnten im Überstand (25 000 x g) nur rund 7% der Gesamtaktivität nachgewiesen werden. Die restliche Aktivität verteilte sich mit 43% auf das Pellet des ersten Zentrifugationsschrittes und 50% auf das 25 000 x g - Pellet. Auch Versuche, durch Zentrifugation von Epithelhomogenaten, die in Gegenwart von 0,2% Triton X-100

hergestellt wurden, eine Anreicherung der Chitinsynthetase im Überstand zu erreichen, führten zu ähnlichen Ergebnissen wie mit Digitonin.

Tabelle 4

Verteilung der Chitinsynthetase in den Fraktionen eines ohne Triton X-100 hergestellten Epithelhomogenates. Die Inkubation erfolgte in Gegenwart von 0,1% des Detergens. (P = Pellet; Ü = Überstand).

Fraktion	Gesamtprotein (mg)	Chitinsynthetase spezifische Aktivität (cpm)	Chitinsynthetase Gesamtaktivität (cpm)	Chitinsynthetase Gesamtaktivität (%)
P 6 200	16,2	2110	34 165	68,8
P 100 000	4,1	3245	13 305	26,8
Ü 100 000	11,9	185	2190	4,4

5. Die Aktivität weiterer im Muskelmagen nachweisbarer Enzyme

Im Muskelmageninhalt, seiner Kutikula und im Homogenat des Muskelmagens wurden Protease- und Amylaseaktivitäten nachgewiesen (Heran, 1956). Bisher ist unklar, ob diese Enzyme vom Epithel des Muskelmagens gebildet werden oder von anderen Stellen des Darmtrakts stammen. Von der im Muskelmagen aktiven trypsinähnlichen Protease wird vermutet, daß der Magen nicht ihr Bildungsort ist (Bibighaus et al., 1972). Mit den folgenden Untersuchungen sollte versucht werden, möglicherweise die Herkunft dieser Verdauungsenzyme zu klären.

5.1 Proteaseaktivität

Die Proteaseaktivität wurde an verschiedenen Fraktionen des Muskelmagens bestimmt, und zwar am Überstand des in destilliertem Wasser aufgenommenen Mageninhalts und dem wässrigen Extrakt der Kutikula. Weiterhin wurden Homogenate von Epithel und Muskulatur des Magens durch Zentrifugation (10 000 x g) in Pellets und Überstände aufgetrennt und die Proben auf die Tätigkeit von Proteasen untersucht.

Die höchste Gesamtaktivität wurde im I-halt des Magens nachgewiesen (Tab. 5). Gleichzeitig ist die spezifische Aktivität dieser Probe am höchsten. Beim Kutikulaextrakt steht der niedrigen Gesamtaktivität eine im Vergleich dazu hohe spezifische Aktivität gegenüber. Die Gesamtaktivität in den Pellets der

Homogenate ist nahezu identisch und mit Werten um 3 U/mg Protein etwa sechsmal höher als der entsprechende Wert im Kutikulaextrakt. Da die Proteasen in den Epithelfraktionen möglicherweise noch nicht aktiviert waren, wurde versucht, durch Inkubation mit Kutikulaextrakt eine Aktivierung zu erreichen. Ein solcher Aktivierungsmodus ist beispielsweise vom Trypsinogen bekannt, das durch Trypsin in den aktiven Zustand überführt werden kann. Die Versuche führten jedoch in keinem Fall zu einer Aktivitätserhöhung.

Tabelle 5

Proteaseaktivität in Fraktionen des Muskelmagens. Eine Einheit (U) entspricht 0,001 Extinktionseinheiten. Ü = Überstand; P = Pellet. Inkubation bei pH 7,5; Dauer 15 Minuten bei 37°C.

Fraktion	spez. Aktivität (U/mg Protein)	Gesamtaktivität (U/mg Gesamtprotein)
Mageninhalt	21,3	180
Epithel Ü.	0,023	0,08
Epithel P.	0,54	3,24
Muskel Ü.	0,05	0,34
Muskel P.	0,4	3,12
Kutikulaextrakt	1,6	0,53

5.2 Amylaseaktivität

Eine Amylase wurde im Verdauungstrakt des Regenwurms ebenfalls bereits von Heran (1956) nachgewiesen. Im Gegensatz zur Proteasebestimmung wurden hier nur Kutikulaextrakte und Überstände der Epithel- sowie Muskelhomogenate untersucht. Als Aktivitätseinheit wurden wie bei der Proteaseaktivität 0,001 Extinktionseinheiten festgesetzt. Auf das Gesamtprotein der untersuchten Proben bezogen, ergibt sich eine Gesamtaktivität von etwa 37 U/ 31,4 mg Protein. Davon entfallen 68% auf den Überstand des Epithelhomogenats, rund 7% auf den Überstand des Muskelhomogenats und annähernd 25% auf den Extrakt der Kutikula. Die spezifischen Aktivitäten ergeben für den Muskelanteil ebenfalls den niedrigsten Wert. Demgegenüber steht eine fast zehnfach höhere spezifische Aktivität des Epithelüberstandes und ein etwa hundertmal höherer Wert des Kutikulaextraktes. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tabelle 6.

Tabelle 6

Amylaseaktivitäten einer Präparation von 20 Muskelmägen.

Fraktion	spezifische Aktivität (U/mg Protein)	Gesamtaktivität (U/Protein)	(%)
Epithel-Überstand	1,6	24,9	67,8
Muskel-Überstand	0,18	2,7	7,3
Kutikula-extrakt	16,0	8,9	24,4

D. Diskussion

Ein Hauptargument für die Wahl des Regenwurms als Versuchsobjekt der vorliegenden Untersuchung war die offensichtlich kontinuierliche Chitinsynthese. Mit Hilfe der zunächst durchgeführten Injektionsversuche mit ^{14}C - Glukose sollte überprüft werden, ob die Chitinsynthese tatsächlich derart kontinuierlich abläuft wie nach den Ergebnissen der Versuche mit ^{3}H - Glukose - behandelten Würmern vermutet wurde. Es wurde zwar auf Autoradiographien von Schnitten des Muskelmagens dieser Regenwürmer eine radioaktiv markierte Bande in der Kutikula beobachtet, die innerhalb von 48 bis 60 Stunden immer weiter zum Lumen des Magens wandert und verschwindet (Peters, unveröff.). Der Beweis, daß es sich bei diesem radioaktiv markiertem Material um Chitin und nicht ein anderes Produkt der Epithelzellen, z.B. Glykoproteine oder Mucopolysaccharide, stand jedoch noch aus.

Die Messung der Radioaktivität in den Kutikulae nach Injektion von ^{14}C - Glukose zeigte, daß die beobachtete Bande zum überwiegenden Teil radioaktiv markiertem Chitin zuzuschreiben ist. Gleichzeitig zeigten diese Versuche, daß die Einbauraten der einzelnen Versuchstiere relativ stark schwanken, obgleich die Regenwürmer ein bis zwei Wochen unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Eine Erklärung für diese Schwankungen könnte ein Aktivitätsrhythmus auch der Chitinsynthese jedes Tieres sein. Von welchen äußeren und inneren Einflüssen ein solcher Rhythmus abhängig sein könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht; es ist jedoch anzunehmen, daß die

Chitinsynthese einer Tagesperiodik unterliegt, die mit der periodischen Nahrungsaufnahme der Regenwürmer (Moser, 1963) gekoppelt sein könnte.

Bei der Präparation von Muskelmägen fielen immer wieder Unterschiede in der Dicke der Kutikulae auf; die unterschiedliche Dicke erscheint infolge des normalerweise offenbar rein mechanischen Abschilferns der Kutikula durch harte Nahrungsteile verständlich. Die Kutikula mancher Würmer war jedoch völlig vom Epithel losgelöst, während einige überhaupt keine Kutikula zu besitzen schienen. Über ähnliche Beobachtungen berichtete schon Vierhaus (1971); er nahm an, daß die Kutikula gehäutet werden kann. Falls dies zutrifft, müßte nach einer Häutung eine verstärkte Chitinsynthese erwartet werden, da das ohne Kutikula ungeschützte Epithel bei der Kontraktion des Muskelmagens durch in der Nahrung vorhandene harte Partikel verletzt werden könnte. Eine zeitweilig verstärkte Chitinsynthese, die vermutlich zudem noch von anderen Faktoren, wie Hunger, Trockenheit, Feuchtigkeit, Temperatur abhängig ist, könnte ein Grund für die Aktivitätsschwankungen nicht nur bei den Versuchen in vivo, sondern auch bei Versuchen mit Epithelhomogenaten sein.

Die Chitinsynthese im Muskelmagen des Regenwurms läuft offensichtlich nicht kontinuierlich - wie bisher vermutet - im Sinne einer dauernden Höchstaktivität ab, sondern ist Schwankungen unterworfen. Im Vergleich zu Arthropoden, deren Chitinsynthese im Integument nur nach Häutungen einen starken Anstieg zeigt, um nach erfolgter Neubildung von Chitin wieder

auf nahezu Null abzusinken, kann die Chitinsynthetase im Muskelmagenepithel des Regenwurms allerdings als dauernd aktiv bezeichnet werden.

Die weiteren Versuche hatten zum Ziel, durch Inkubation von ganzen Muskelmägen in vitro einen Einbau von radioaktiv markiertem Substrat in Chitin zu erreichen. Die Inkubationen führten sowohl bei Verwendung von UDP - ^{14}C - GlcNAc als auch von ^{14}C - Glukose als Substrat zu niedrigen Einbauraten. Im Fall von UDP - GlcNAc ist der Grund dafür offensichtlich die Schwierigkeit, die das Molekül beim Durchtritt durch Membranen hat; zum gleichen Ergebnis führten auch Untersuchungen der Chitinsynthese im Integument von Wanderheuschrecken, bei denen ebenfalls UDP - GlcNAc als Substrat diente (Surholt und Zebe, 1972). Versuche, das Abdominalintegument der Heuschrecke Melanoplus sanguinipes mit verschiedenen Substraten zu inkubieren, führten im Vergleich zu Glukose bzw. GlcNAc ebenfalls zu einem deutlich geringeren Einbau von UDP - GlcNAc (Vardanis, 1976).

Nach Inkubation von Muskelmägen mit Glukose, die Membranen leichter passieren kann, wurde ein höherer Umsatz des Substrates erwartet. Der Einbau in Chitin war jedoch fast identisch mit der Einbaurate, die im Falle von UDP - GlcNAc erreicht wurde. Die gleiche Beobachtung machten auch Surholt und Zebe (1972), deren Versuche an Wanderheuschrecken ebenfalls keinen Unterschied im Einbau von Glukose und UDP - GlcNAc ergaben.Ein Grund könnte die im

Vergleich zu UDP - GlcNAc äußerst unspezifische Glukose sein, deren höhere Konzentration in der Zelle sich nicht auf den Einbau in Chitin auswirkt, da sie zu einem großen Teil in anderen Enzymketten verbraucht wird. Die Versuche mit Regenwürmern in vivo zeigten, daß nur ein sehr geringer Teil der von der injizierten Glukose stammenden Radioaktivität, nämlich etwa 2%, im Chitin der Muskelmagenkutikula nachweisbar ist.

Um dem Substrat UDP - GlcNAc den Eintritt in die Epithelzellen zu erleichtern, wurden die weiteren Inkubationen in Gegenwart des Detergens Triton X-100 durchgeführt. Diese Versuche führten zu einem erheblich gesteigerten Umsatz von UDP - GlcNAc, während sich der Einbau von Glukose vergleichsweise wenig veränderte. Die Tatsache, daß das Detergens auf den Glukoseeinbau in Chitin keinen Einfluß hat, unterstützt einerseits die Annahme, daß dieser Zucker auch anderen Enzymketten als Substrat dient; andererseits könnten einige Enzyme der Chitinsynthese durch Triton X-100 gehemmt werden, während die Chitinsynthetase bei der verwendeten Konzentration noch aktiv bliebe. In beiden Fällen würde eine erhöhte Glukosekonzentration zu keinem höheren Einbau in Chitin führen.

Die Wirkung von Triton X-100 scheint aber nicht nur darin zu bestehen, dem Substrat Eingang in die Zellen zu verschaffen; das Detergens löst offensichtlich auch die Membranen von Organellen auf, in denen die Chitinsynthetase lokalisiert ist. Dies

läßt sich aus der Tatsache ablesen, daß das Epithelhomogenat ohne Triton X-100 ebenso wie die ganzen Muskelmägen eine geringere Chitinsynthetaseaktivität aufweist als in Gegenwart des Detergens.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Chitinsynthetase von Membranen umschlossen ist und nach Behandlung mit Triton X-100 frei wird oder auch an diese Membranen gebunden ist. Untersuchungen an Pilzen zeigten, daß die Plasmamembran Sitz der Chitinsynthetase ist (McMurrough et al., 1971; Cabib und Bowers, 1971; Jan, 1974; Gooday und de Rousset-Hall, 1975; Vermeulen et al., 1978). Die Ergebnisse der Differentialzentrifugation von Epithelhomogenaten zeigen, daß es auch nach Triton- bzw. Digitoninbehandlung zu keiner Anreicherung der Chitinsynthetase im Überstand kommt; es ist daher unwahrscheinlich, daß das Enzym löslich und in Vesikeln eingeschlossen ist. Vielmehr ist anzunehmen, daß ein großer Anteil der Chitinsyntetase des Regenwurms zwar in Vesikeln vorhanden, jedoch an deren Membran gebunden ist. In diesem Fall könnte Triton diese Vesikel in Membranteile auflösen, so daß anschließend das Substrat zum immer noch membrangebundenen Enzym gelangen kann.

Eine Steigerung der Enzymaktivität durch Digitonin ist in ähnlichen Größenordnungen wie bei Verwendung von Triton X-100 möglich; und zwar sowohl bei ganzen Muskelmägen als auch im Epithelhomogenat. Digitonin löst ebenso wie Triton X-100 Membranen auf, so daß diese Ergebnisse die Annahme einer membrangebundenen

Chitinsynthetase im Epithel des Muskelmagens unterstützt. Im Gegensatz zur Chitinsynthetase des Pilzes Coprinus cinereus (Gooday und de Rousset-Hall, 1975) führt weder der Gebrauch von Triton X-100 noch von Digitonin zu einem Freiwerden des Enzyms, d.h. nach Zentrifugation zu einer Anreicherung im Überstand. Möglicherweise ist hierfür die Größe der Membranteilchen und damit ihre Sedimentierbarkeit nach Triton- bzw. Digitoninbehandlung verantwortlich. Es sind weitere Versuche notwendig um zu klären, ob dies zutrifft; dabei müßte das Epithelhomogenat in Gegenwart verschiedener Triton- bzw. Digitoninkonzentrationen durch Differentialzentrifugation aufgetrennt werden.

Mit einer Lokalisierung der Chitinsynthetase an den Membranen von Vesikeln ist noch nicht die Frage gelöst, wo die Chitinsynthese stattfindet und auf welche Weise das Chitin aus der Zelle transportiert werden kann. Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie legen den Schluß nahe, die Chitinsynthetase im apikalen Teil der Mikrovilli zu suchen. In Schnitten durch das Epithel waren erstens niemals Chitinmikrofibrillen zwischen den Mikrovilli sichtbar, sondern die Kutikula war meist mit den Spitzen der Mikrovilli verhaftet. Zweitens sprechen auch die in der Kutikula vorhandenen Vertiefungen, die in Form und Durchmesser den Mikrovilli entsprechen (Vierhaus, 1971), für eine solche Lokalisierung des Enzyms.

Während die Mikrovilli als Sitz der Chitinsynthetase erscheinen, ist der Bildungsort sowohl des Enzyms als auch seines Substrats mit einiger Wahrscheinlichkeit in Organellen der Zelle zu suchen. Um das Enzym an den Ort seines Wirkens - die Mikrovilli - zu bringen, ist ein Transport notwendig, der in Vesikeln, möglicherweise zusammen mit Substrat erfolgen dürfte; im apikalen Bereich der Zellen, oberhalb der mitochondrienhaltigen Zone, sind eine ganze Anzahl kleiner Vesikel erkennbar, die mit diesem Transport in Zusammenhang stehen könnten (Abb. 3b). Auch wenn diese Vesikel nicht bis in die Mikrovilli zu verfolgen sind, könnten sie in die Mikrovilli wandern, wo ihre Membran mit daran gebundener Chitinsynthetase unter gleichzeitiger Abgabe des Substrats in die Zellmembran eingebaut würde. Ein Transport mit nachfolgender Ausschleusung der Chitinsynthetase aus der Zelle wird bei Pilzen den sogenannten Chitosomen zugeschrieben (Ruiz-Herrera et al., 1975; Bracker et al., 1976). Diese 40 - 70 nm im Durchmesser messenden Strukturen konnten aus einer Reihe von Pilzen isoliert werden und synthetisierten während Inkubation mit UDP - GlcNAc Chitinmikrofibrillen.

Ein zum Lumen des Muskelmagens orientiertes Enzym wäre infolge der Einwirkung von Proteasen einem relativ schnellen Verschleiß ausgesetzt; folglich müßte für einen dauernden Nachschub neuen Enzyms gesorgt werden. Ob die Chitinsynthetase tatsächlich außen an die Zellmembran gebunden ist, kann nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Falls das Enzym jedoch innerhalb der Zelle zu

suchen ist, müßten die Chitinmoleküle aus der Zelle nach außen transportiert werden. Da das Chitin hierbei eine Membran passieren müßte, führten die an einigen Pilzen gewonnenen Erkenntnisse zur Vorstellung eines lipidähnlichen Zwischenprodukts der Chitinsynthese, welches ohne Schwierigkeiten die Zellmembran durchdringen kann (McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971; Endo et al.,1970; Quesada-Allue et al., 1976). Ein solches lipidähnliches Zwischenprodukt konnte bisher jedoch in keiner Untersuchung nachgewiesen werden.

Bei einem Transport der Chitinsynthetase innerhalb eines Vesikels stellt sich die Frage, ob das Enzym schon aktiv ist oder erst nach Erreichen seines Wirkungsortes aktiviert wird. Die Untersuchungen an der Chitinsynthetase der Pilze machten eine Regulation über ein Aktivator/Inhibitor - System wahrscheinlich (Cabib und Farkas, 1971). Aus Präparationen der Hefen Saccharomyces cerevisiae sowie S. carlsbergiensis konnten ein Aktivator (Proteinase B) und ein Inhibitor dieser Proteinase isoliert werden (Cabib und Farkas, 1971; Cabib und Keller, 1971; Ulane und Cabib, 1974; Ulane und Cabib, 1976). Die Aktivierung der Chitinsynthetase konnte aber an Stelle des aktivierenden Faktors auch mit exogenen Proteasen, z.B. Trypsin erreicht werden (Cabib und Farkas, 1971; Ruiz-Herrera und Bartnicki-Garcia, 1974). Es wurden inzwischen weitere Proteasen getestet; dabei zeigte sich, daß neben Trypsin neutrale Proteasen am wirkungsvollsten sind (Bartnicki-Garcia et al., 1978). Außerdem wurde festgestellt, daß die Wirksamkeit der untersuchten Proteasen nicht bei jedem Pilz gleich hoch ist.

Bei Versuchen, eine Aktivierung der Chitinsynthetase des Regenwurms durch Proteasen zu erreichen, wurden Trypsin bzw. neutrale Protease in Konzentrationen verwendet, die bei der Synthetase einer Reihe von Pilzen eine gute Wirkung hatten. In allen diesen Versuchen wurde ebenso wie mit dem proteasehaltigen Kutikulaextrakt im Vergleich zum Enzym aus Pilzen nur eine niedrige Aktivitätserhöhung beobachtet. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß die Wirkung der Proteasen in erster Linie auf eine Zerstörung enzymhaltiger Zellorganellen und nicht eine Aktivierung der Chitinsynthetase zurückzuführen ist. Die Wirkung der Proteasen wäre dann ähnlich dem durch Triton X-100 bzw. Digitonin bewirkten Effekt: der Auflösung von Zellorganellen unter Ausbildung von Membranfragmenten mit daran gebundener Chitinsynthetase. Die verglichen mit der durch Triton X-100 verursachten Aktivitätserhöhung schwache Wirkung der Proteasen dürfte an ihrer geringeren Effektivität und der gleichzeitigen Zerstörung eines Teils der Chitinsynthetase beruhen.

Die in Gegenwart des Proteaseinhibitors Trasylol beobachtete weitere Aktivitätserhöhung erscheint nur verständlich, wenn das Enzym des Regenwurms nahezu vollständig im aktiven Zustand vorliegt und eine fortschreitende Zerstörung durch Proteasen, sowohl exogener als auch endogener, verhindert wird. Ein ähnliches Verhalten konnte bei der Chitinsynthetase des dimorphisch auftretenden Pilzes Mucor rouxii festgestellt werden. Während die inaktive Chitinsynthetase der Hefeform durch Proteasen stark aktivierbar ist, führt die entsprechen-

de Behandlung des überwiegend aktiviert vorliegenden Enzyms der mycelbildenden Form nach kurzer Zeit zur Aktivitätsabnahme (Ruiz-Herrera und Bartnicki-Garcia, 1976). Die während der Inkubation von Epithelhomogenaten nach 30 Minuten zu beobachtende Aktivitätsabnahme (Abb. 9) ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf die zunehmende Zerstörung der Chitinsynthetase durch endogene Proteasen zurückzuführen.

Trotz eines Enzyms, das zum überwiegenden Teil im aktiven Zustand vorliegt, ist anzunehmen, daß eine Aktivierung neugebildeter Chitinsynthetase in ähnlicher Weise erfolgt, wie bei dem Enzym der Pilze.

Eine Erhöhung der Chitinsynthetaseaktivität in Gegenwart von N - Acetylglukosamin konnte bei einer großen Anzahl von Pilzen erzielt werden (Glaser und Brown, 1957; Porter und Jaworski, 1966; Camargo et al., 1967; McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971; Keller und Cabib, 1971; Jan, 1974). Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkungsweise des Aminozuckers führten zu der Annahme, das GlcNAc als allosterischer Aktivator fungiert (Camargo et al., 1967; McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971; de Rousset-Hall und Gooday, 1975; Ruiz-Herrera et al., 1977). Die Stimulierung der Chitinsynthetase durch GlcNAc scheint allerdings spezifisch für das membrangebundene Enzym zu sein; bei Versuchen, die das Enzym durch Behandlung mit Butanol (Glaser und Brown, 1957) oder Digitonin (de Rousset-Hall und Gooday, 1975; Duran und Cabib,

1977) in eine lösliche Form überführten, erfolgte nur eine sehr geringe Aktivitätserhöhung durch den Aminozucker.

Die Inkubation des Epithelhomogenats mit GlcNAc führte, verglichen mit Präparationen von Pilzenzym, zu einer ziemlich geringen Aktivitätssteigerung. So konnte die Aktivität des Regenwurmenzyms durch 100 mM GlcNAc nur auf das 1,5 - fache erhöht werden, während die Chitinsynthetase der Hefe Saccharomyces carlsbergiensis eine Aktivitätserhöhung auf das fünffache (Keller und Cabib, 1971), und Enzymfraktionen des Pilzes Phycomyces blakesleeanus schon in Gegenwart von 50 mM GlcNAc eine auf das vierfache erhöhte Aktivität zeigte (Jan, 1974). Da die Epithelhomogenate des Regenwurms mit Triton X-100, das eine dem Digitonin vergleichbare Wirkung hat, behandelt wurden, ist anzunehmen, daß die geringe Stimulierung der Chitinsynthetase des Regenwurms auf die Anwesenheit des Detergens zurückzuführen ist.

Bei der Verknüpfung von UDP - GlcNAc zu Chitinmolekülen wird das Nukleotid UDP frei. Von Pilzen ist bekannt, daß UDP die Chitinsynthetase stark hemmt (Keller und Cabib, 1971; McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971; Jan, 1974; de Rousset-Hall und Gooday, 1975). So wird die Chitinsynthetase des Pilzes Phycomyces blakesleeanus durch 0,1 mM UDP um 75% gehemmt (Jan, 1974). Vorversuche am Epithelhomogenat führten beim Enzym des Regenwurms ebenfalls zu einer starken Hemmung. Weitere Versuche, in denen das Nukleotid in unterschiedlichen

Konzentrationen verwendet wurde, zeigten, daß die Hemmung in der gleichen Größenordnung liegt, wie bei Pilzenzymen beschrieben. Der starke Einfluß von UDP auf die Aktivität der Chitinsynthetase des Regenwurms wird durch die Aktivitätssteigerung auf etwa das Doppelte deutlich, wenn die Inkubation des Epithelhomogenats in Gegenwart von Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat durchgeführt wurde, um endogenes UDP abzubauen. Aus der relativ hohen UDP - Konzentration im unbehandelten Epithelhomogenat könnte weiterhin geschlossen werden daß dieses Nukleotid an einer Regulation der Chitinsynthetase beteiligt ist; dies könnte über eine Art Rückkopplungsmechanismus erfolgen, an dem eine Phosphatase beteiligt ist.

Von besonderem Interesse erschien das Verhalten der Chitinsynthetase des Regenwurms gegenüber Inhibitoren der Chitinsynthese. Ziel war dabei, erstens die Wirksamkeit bekannter Inhibitoren der Chitinsynthetase zu testen und zweitens durch eine möglicherweise positive Reaktion einen weiteren Beweis für die Tätigkeit dieses Enzyms im Epithelhomogenat zu erhalten. Daneben sollte auch die Wirkung von Inhibitoren deren Wirkungsort nicht eindeutig festgelegt werden kann, gestestet werden.

Einer dieser Inhibitoren ist das Polyoxin, welches relativ spezifisch und kompetitiv die Chitinsynthetase sowohl von Pilzen als auch von tierischen Untersuchungsobjekten hemmt (Endo et al., 1970; Ohta et al., 1970; Hori et al., 1971; Keller und Cabib, 1971; Bartnicki-Garcia und Lippman, 1972;

Sowa und Marks, 1975; Vardanis, 1976; Archer, 1977; Becker, 1980). Das von einem Pilz gebildete Antibiotikum Polyoxin tritt in verschiedenen Formen auf (Hori et al., 1971), deren Struktur zum Teil durch chemische Methoden verändert wurde (Hori et al., 1971; Isono et al, 1972). Für die Hemmversuche an der Chitinsynthetase wird meist Polyoxin A bzw. D benutzt.

Eine Hemmung der Chitinsynthetase durch Polyoxin A und D bei tierischen Untersuchungsobjekten (Sowa und Marks, 1975; Vardanis, 1976; Becker, 1980) lassen eine weitgehende Ähnlichkeit der Chitinsynthetase von Pilzen und Tieren vermuten (Sowa und Marks, 1975). Verglichen mit der Hemmung der Chitinsynthetase einiger Pilze (Hori et al., 1971; Archer, 1977) liegt die Sensitivität des Regenwurmenzyms gegenüber Polyoxin D in gleichen Größenordnungen. Beim Vergleich mit dem Enzym verschiedener anderer Pilze und insbesondere bisher untersuchten tierischen Systemen (Sowa und Marks, 1975; Vardanis, 1976) erscheint die Chitinsynthetase des Regenwurms allerdings gegenüber dem Inhibitor weniger empfindlich. Übereinstimmend mit allen bisher untersuchten Chitinsynthetasen ist die Hemmung auch beim Regenwurm kompetitiv, wie die Abnahme der Inhibierung nach Erhöhung der Substratkonzentration zeigt. Der nahezu vollständige Verlust der Sensitivität gegenüber Polyoxin D in Gegenwart des Komplexbildners EGTA an Stelle von EDTA ist schwer verständlich. Möglicherweise ist die Sensitivität der Chitinsynthetase von der An- bzw. Abwesenheit bestimmter zweiwertiger Metallionen abhängig. Die Versuche

zur Wirkung von Mg^{2+}- Ionen zeigten deutlich, daß die Aktivität der Chitinsynthetase des Regenwurms ebenso wie das Enzym anderer Untersuchungsobjekte durch dieses zweiwertige Metallion in der verwendeten Konzentration positiv beeinflußt wird, während Ca^{2+}- Ionen hemmend wirken (Keller und Cabib, 1971; McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971; Jan, 1974; Quesada-Allue et al., 1976; Muzzarelli, 1977). Während EDTA sowohl Mg^{2+}- als auch Ca^{2+}- Ionen bindet, ist beim EGTA eine größere Affinität gegenüber Ca^{2+}- Ionen vorhanden. Daher dürfte es in Anwesenheit von EGTA zu einer Verschiebung des Mg^{2+}-Ca^{2+}- Verhältnisses zugunsten von Mg^{2+} kommen. Bei EDTA dürfte dieser Effekt geringer sein. Es ist möglich, daß durch eine insgesamt höhere Konzentration an freiem Mg^{2+}- Ionen eine Stabilisierung der Chitinsynthetase erfolgt, die sich in einer veringerten Sensitivität gegenüber Polyoxin D äußert.

Ein weiterer bekannter Inhibitor der Chitinsynthese ist das Insektizid Dimilin. Während Polyoxin D sowohl bei Pilzen als auch bei Insekten wirksam ist, hemmt das neuerdings als Insektizid verwendete Dimilin nur die Chitinsynthese der Insekten (van Eck, 1979). Trotz einer ganzen Reihe Untersuchungen zur Wirkung von Dimilin (Sowa und Marks, 1975; Salama et al., 1976; Becker, 1978; van Eck, 1979) konnte bisher nicht eindeutig festgestellt werden, ob das Insektizid direkt auf die Chitinsynthetase oder auf ein anderes an der Chitinsynthese beteiligtes Enzym wirkt. Marks und Leighton (1980) vermuten, daß Dimilin als Proteaseinhibitor wirkt und auf diese Weise

die Aktivierung der inaktiven Form der Chitinsynthetase durch den Aktivator verhindert.

Obgleich die Chitinsynthetase des Regenwurms zum überwiegenden Teil in der aktiven Form vorliegen dürfte, ist anzunehmen, daß neugebildetes, noch inaktives Enzym durch eine spezifische Protease aktiviert wird. Wenn diese Protease tatsächlich der Wirkungsort des Dimilins ist, erscheint der Verlauf der Hemmungskurve des Regenwurms nach Inkubation mit Dimilin verständlich. Nach vollständiger Hemmung dieser aktivierenden Protease wird auch durch weitere Erhöhung der Inhibitorkonzentration keine weitere Hemmung bewirkt, da keine weiteren Bindungsstellen für das Insektizid vorhanden sind. Folglich würde die Gesamtaktivität im Epithelhomogenat um etwa den Anteil der inaktiven Chitinsynthetase gesenkt, welche ohne den Inhibitor im Verlauf der Inkubation noch aktiv geworden wäre.

Voraussetzung für einen solchen Wirkungsmodus ist allerdings eine hohe Spezifität des Inhibitors in Bezug auf die aktivierende Protease und eine höhere Wirksamkeit dieses Enzyms bei der Aktivierung der Chitinsynthetase verglichen mit anderen Proteasen. In einer hohen Spezifität des Dimilins für bestimmte Proteasen könnte der Grund für seine Unwirksamkeit gegenüber Pilzen liegen.

Verglichen mit der Hemmung der Chitinsynthese im Epithelhomogenat des Regenwurms hat Dimilin eine weitaus stärkere Wirkung auf die Chitinsynthese des Integuments von Insekten (Sowa und Marks,

1975; van Eck, 1979); bei Versuchen in vitro konnte dort eine Hemmung bis etwa 90% erreicht werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Chitinsynthetase aus dem Integument in weit stärkerem Maße erst durch eine spezielle Protease aktiviert werden muß als das Enzym aus chitinsynthetisierenden Darmgeweben. So konnten bei histologischen Schnitten des Darmgewebes von Schmetterlingslarven auch nach Verabreichung von letalen Dosen des Insektizids keine Veränderungen nachgewiesen werden; Schnitte durch die Epidermis zeigten dagegen starke Veränderungen (Salama et al., 1976). Bei der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala werden in der Cardia kontinuierlich peritrophische Membranen gebildet. Wurde die Cardia in vitro Dimilin in Konzentrationen von 0,01 bis 10 mg/ ml ausgesetzt, konnte die Bildungsrate von peritrophischen Membranen um maximal 30% reduziert werden (Becker, 1978).

Das unterschiedliche Verhalten der Chitinsynthetase gegenüber Dimilin, je nachdem ob sie aus Darmgewebe oder aus dem Integument stammt, ist daher offensichtlich von ihrem Zustand abhängig. Während die Chitinsynthetase des Darmgewebes überwiegend im aktiven Zustand vorliegen dürfte, ist im Integument anscheinend die inaktive Form vorherrschend. Für eine nahezu ständige Chitinsynthese, wie sie bei der Bildung von peritrophischen Membranen und auch bei der Bildung der Kutikula des Muskelmagens erfolgt, ist dies auch zu erwarten.

Die Untersuchungen der Aktivitäten von im Muskelmagen nachweisbaren Verdauungsenzymen sollten ein Versuch zur Klärung ihrer Herkunft sein; insbesondere ob das Epithel des Muskelmagens an ihrer Synthese beteiligt ist.

Verglichen mit dem Proteasegehalt des Mageninhalts konnten in den Fraktionen des Epithel- und Muskelhomogenats nur geringe Aktivitäten nachgewiesen werden. Die Möglichkeit, daß die Proteasen in diesen Proben noch im inaktiven Zustand vorliegen, erscheint nach den negativen Ergebnissen der Aktivierungsversuche mit aktiver Regenwurmprotease unwahrscheinlich. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß die Aktivierung auf eine andere Weise bewirkt wird. Auch der pH - Wert von 7,5 während der Aktivitätsbestimmungen dürfte keinen Einfluß gehabt haben, da der im Muskelmagen herrschende pH - Wert zwischen 6,7 und 7,6 schwankt (Heran, 1954).

Obgleich die Proben während der Präparation mit mehrfach gewechseltem destillierten Wasser gewaschen wurden, ist nicht auszuschließen, daß trotzdem Enzym von einer Probe in die andere verschleppt wurde. Es kann jedoch keine eindeutige Aussage zum Bildungsort der Proteasen gemacht werden, auch wenn es so erscheint als handelte es sich bei den Proteaseaktivitäten in Epithel- und Muskelfraktionen um verschlepptes sowie bei den Aktivitäten im Kutikulaextrakt um eindiffundiertes Enzym. Versuche den Bildungsort des im Darmtrakt nachweisbaren trypsinähnlichen Verdauungsenzyms

zu bestimmen, führten jedoch ebenfalls zu der Vermutung, daß es nicht im Muskelmagen gebildet wird (Bibighaus et al., 1972).

Insgesamt ebenso unbefriedigend sind die Versuche zur Lokalisierung des Bildungsortes der Amylase. Der Versuch, Amylaseaktivitäten im Epithel des Muskelmagens mit Hilfe Substratbefilmter Objektträger an Schnitten unfixierter Muskelmägen nachzuweisen (Adam und Czihak, 1964), führte zu keinen verwertbaren Ergebnissen; offensichlich kommt es infolge der geringen Objektgröße zu einer Verschmierung der Amylase. Nach Bestimmung der Amylaseaktivitäten in Fraktionen des Muskelmagens kann allenfalls vermutet werden, daß ein Teil des Enzyms im Epithel des Magens gebildet wird, da im Überstand des Epithelhomogenats die höchste Aktivität aller untersuchten Proben meßbar war.

Falls die Verdauungsenzyme im Epithel des Muskelmagens gebildet werden, ist es wahrscheinlich, daß sie in die Kutikula eingeschlossen werden. Poren bzw. Kanäle, die einen Durchtritt von Enzymen in das Magenlumen ermöglichen würden, konnten bisher in der Kutikula nicht festgestellt werden (Vierhaus, 1971). Mit dem Abschilfern der Kutikula würden die Verdauungsenzyme dann frei und unter die Nahrung gebracht. Die Kutikula wäre in diesem Fall als Enzymträger zu betrachten, der gleichzeitig das Epithel des Muskelmagens schützt, wenn durch Kontraktion dieses Organs die Nahrung zerkleinert und durchmischt würde.

Eine solche Funktion des Muskelmagens und seiner Kutikula legt den Vergleich mit dem Magen vieler Mollusken nahe. Diese besitzen eine chitinhaltige Auskleidung, den sogenannten Magenschild, in ihrem Magen. Der Magen dieser Mollusken kann zur mechanischen Zerkleinerung dienen. Außerdem rotiert auf dem Magenschild ein sogenannter Kristallstiel, der bei Bivalviern Verdauungsenzyme enthält (Purchon, 1968). Während der Drehung des Kristallstiels löst dieser sich auf und gibt die Verdauungsenzyme frei. Die Kutikula im Muskelmagen des Regenwurms hätte bei diesem Vergleich eine Doppelfunktion; sie diente sowohl als Schutz vor Verletzungen wie auch als Enzymträger.

In künftigen Versuchen müßte genauer geklärt werden inwieweit das Epithel des Muskelmagens neben der Chitinsynthese auch an der Bildung von Verdauungsenzymen beteiligt ist. Außerdem müßten weitere Untersuchungen an der isolierten Chitinsynthetase eine Bestätigung der bisher aus dem Verhalten des Enzyms im Epithelhomogenat gezogenen Schlußfolgerungen erbringen. Daneben erscheint die Aufklärung der Regulation der Chitinsynthese von besonderem Interesse. Erste Versuche, das Epithelhomogenat in chitinsynthetasehaltige Fraktionen aufzutrennen, wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung schon unternommen.

E. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen am Muskelmagen des Regenwurms Lumbricus terrestris L. erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Das Epithel des Muskelmagens ist einschichtig und besteht aus etwa 50 µm hohen Zellen, deren Durchmesser ca. 8 µm beträgt. Die Zellen besitzen apikal einen Mikrovillisaum; die Spitzen der Mikrovilli sind meist von der den Muskelmagen auskleidenden sogenannten Kutikula eingehüllt.

2. Die von den Epithelzellen abgeschiedene Kutikula enthält einen großen Anteil durch Wasser extrahierbare Verdauungsenzyme. Nach Extraktion mit SDS/Harnstoff ergibt sich für die Kutikula ein Proteingehalt von 44,9% ± 7,1%; ihr Chitingehalt beträgt 28,7% ± 5,7%.

3. Nach Inkubation von Muskelmägen bzw. Epithelhomogenaten mit UDP - GlcNAc wurde ein Einbau des Substrates in ein alkali-unlösliches Produkt festgestellt, das als Chitin identifiziert wurde. Bei dem UDP - GlcNAc transferierenden Enzym handelt es sich daher um die Chitinsynthetase des Regenwurms.

4. Die Aktivität der Chitinsynthetase konnte durch das Detergens Triton X-100 erhöht werden; eine Konzentration von 0,1% Triton X-100 während der Inkubation bewirkte eine etwa 20-fache Aktivitätssteigerung. Eine entsprechende Aktivitätserhöhung ist durch Digitonin (10 mg/ml) möglich.

5. Die vorläufige Charakterisierung des Regenwurmenzyms zeigte, daß es wie die Chitinsynthetase der Pilze membrangebunden ist. Weiterhin wird durch Mg^{2+}- Ionen eine Aktivitätssteigerung bewirkt, während Ca^{2+}- Ionen das Enzym hemmen. Das Nukleotid UDP, das beim Umsatz von UDP - GlcNAc frei wird, erwies sich als starker Inhibitor der Chitinsynthetase des Regenwurms. Die relativ hohe Konzentration von endogenem UDP läßt eine Beteiligung des Nukleotids an der Regulation der Chitinsynthese des Muskelmagens vermuten.

6. Im Gegensatz zu der Mehrzahl der bisher untersuchten Pilze ist die Chitinsynthetase des Regenwurms durch Proteasen, auch durch körpereigene, vergleichsweise nur in geringem Maße aktivierbar. Durch einen Proteaseinhibitor dagegen ist eine Aktivitätserhöhung möglich. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Chitinsynthetase des Regenwurms nahezu vollständig im aktiven Zustand vorliegt.

7. Ein weiterer Inhibitor der Chitinsynthetase des Regenwurms ist das Antibiotikim Polyoxin D. Die Hemmung ist wie bei der Chitinsynthetase der Pilze kompetitiv; jedoch erscheint das Enzym des Regenwurms weniger sensitiv gegenüber dem Inhibitor als die Synthetase anderer Untersuchungsobjekte.

8. Das Insektizid Dimilin hemmt die Chitinsynthese im Integument der Insekten. Die Verwendung des

Insektizids führte beim Epithelhomogenat zu einer Hemmung der Chitinsynthese von etwa 15%. Da auch durch Erhöhung der Inhibitorkonzentration keine höhere Hemmung erreichbar war, ist anzunehmen, daß Dimilin nicht auf die Chitinsynthetase, sondern den Aktivator des Enzyms wirkt.

9. Die Untersuchungen an im Muskelmagen aktiven Verdauungsenzymen ließen nicht eindeutig erkennen, ob sie vom Epithel des Muskelmagens gebildet werden. Von der Funktion her betrachtet erscheint der Muskelmagen mit dem Magen vieler Mollusken vergleichbar, gleichgültig ob die Verdauungsenzyme von seinem Epithel synthetisiert werden oder aus dem Magenlimen in die Kutikula eindiffundieren. Die Kutikula des Muskelmagens hat bei diesem Vergleich sowohl die Aufgabe des chitinhaltigen Magenschildes als auch des enzymhaltigen Kristallstiels der Bivalvier zu erfüllen, nämlich das Epithel zu schützen und als Enzymträger zu wirken.

F. Literaturverzeichnis

Adam, H. und Czihak, G. (1964). Großes Zoologisches Großpraktikum. Teil 1. Arbeitsmethoden. Verlag Gustav Fischer Stuttgart.

Archer, D. B. (1977). Chitin biosynthesis in protoplasts and subcellular fractions of Aspergillus fumigatus. Biochem. J. 164, 653-658.

Barber, G. A., Elbein, A. D. und Hassid, W. Z. (1964). The synthesis of cellulose by enzyme systems of higher plants. J. Biol. Chem. 239, 4056

Bartnicki-Garcia, S. und Lippman, E. (1972). Inhibition of Mucor rouxii by Polyoxin D: effects on chitin synthetase and morphological development. J. Gen. Microbiol. 71, 301-309.

Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C. E., Reyes, E. und Ruiz-Herrera, J. (1978). Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils in vitro. Expl. Mycol. 2, 173-192.

Becker, B. (1978). Effects of 20-hydroxy-ecdysone, juvenile hormone, Dimilin, and Captan on in vitro synthesis of peritrophic membranes in Calliphora erythrocephala. J. Insect Physiol. 24, 699-705.

Becker, B. (1980). Effects of polyoxin D on in vitro synthesis of peritrophic membranes in Calliphora erythrocephala. Insect Biochem. 10, 101-106.

Bibighaus, C. L., DeVillez, E. J. und Allenspach, A. L. (1972). Histochemical localization of production and secretion of trypsin in the earthworm Lumbricus terrestris. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 130, 429-439.

Bitter, T. und Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4, 330-334.

Bracker, Ch. E., Ruiz-Herrera, J. und Bartnicki-Garcia, S. (1976). Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during micrifibril synthesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 4570-4574.

Brummond, D. O. und Gibbons, A. P. (1965). Enzymatic cellulose-synthesis from UDP-(^{14}C)-Glukose by Lupinus albus. Biochem. Z. 342, 308-318.

Cabib, E. und Bowers, B. (1971). Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast and bud scars. J. Biol. Chem. 246, 152-159.

Cabib, E. und Keller, F. A. (1971). Chitin and yeast budding. Allosteric inhibition of chitin synthetase by a heat-stable protein from yeast. J. Biol. Chem. 246, 167-173.

Cabib, E. und Farkas, V. (1971). The control of morphogenesis: an enzymatic mechanism for the initiation of septum formation in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2052-2056.

Camargo, E. P., Dietrich, C. P., Sonneborn, D. und Strominger, J. L. (1967). Biosynthesis of chitin in spores and growing cells of Blastocladiella emersonii. J. Biol. Chem. 242, 3121-3128.

Candy, D. J. und Kilby, B. A. (1962). Studies on chitin synthesis in the desert locust. J. Exp. Biol. 39, 129-140.

Carey, F. G. (1965). Chitin synthesis in vitro by crustacean enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 16, 155-158.

Duran, A. und Cabib, E. (1978). Solubilization and partial purification of yeast chitin synthetase. J. Biol. Chem. 253, 4419-4425.

Eck, van, W. H. (1979). Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. Insect Biochem. 9, 295-300.

Elbein, A. D., Barber, G. A. und Hassid, W. Z. (1964). The synthesis of cellulose by an enzyme system from a higher plant (Phaseolus aureus). FED PROC 23, 379

Endo, A., Kakiki, K. und Misato, T. (1970). Mechanism of action of antifungal agent polyoxin D. J. Bacteriol. 104, 189-196.

Flowers, H. M., Batra, K. K., Kemp, J. und Hassid, W. Z. (1968). Biosynthesis of insoluble glucans from Uridinediphosphate-D-glucose with enzyme preparations from Phaseolus aureus and Lupinus albus. Plant Physiol. 43, 1703-1709.

Glaser, L. und Brown, D. H. (1957). The synthesis of chitin in cell-free extracts of Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 228, 729-742.

Gooday, G. W. und de Rousset-Hall, A. (1975). Properties of chitin synthetase from Coprinus cinereus. J. Gen. Microbiol. 89, 137-145.

Gwinn, J. F. und Stevenson, J. R. (1973). Role of acetylglucosamine in chitin synthesis in crayfish. - I. Correlation of ^{14}C-acetylglucosamine incorporation with stages of the molting cycle. Comp. Biochem. Physiol. 45 B, 769-776.

Hall, D. A., Happey, F., Lloyd, P. F. und Saxl, H. (1958). Mammalian cellulose. Nature 181, 470

Heran, H. (1954). Die Wasserstoffionenkonzentration im Darm von Lumbricus terrestris L. Z. vergl. Physiol. 36, 55-65.

Heran, H. (1956). Ein Beitrag zur Verdauungsphysiologie von Lumbricus terrestris L. Z. vergl. Physiol. 39, 44-62.

Hohnke, L. A. (1971). Enzymes of chitin metabolism in the decapod Hemigrapsus nudus. Comp. Biochem. Physiol. 40 B, 757-779.

Hori, M., Kakiki, K., Suzuki, S. und Misato, T. (1971). Studies on the mode of action of polyoxins: III. Relation of polyoxin structure to chitin synthetase inhibition. Agr. Biol. Chem. 35, 1280-1291.

Hornung, D. E. und Stevenson, J. R. (1971). Changes in the rate of chitin synthesis during crayfish molting cycle. Comp. Biochem. Physiol. 40 B, 341-346.

Huxley, H. E. (1963). Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. J. Molec. Biol. 7, 281-308.

Isono, K., Asahi, K. und Suzuki, S. (1969). Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. XIII. The structure of polyoxins. J. Amer. Chem. Soc. 91, 7490-7505.

Isono, K., Suzuki, S. und Azuma, T. (1972). Semisynthetic polyoxins: aminoacyl derivatives of Polyoxin C and their in vitro activity. Agr. Biol. Chem. 35, 1986-1989.

Jan, Y. N. (1974). Properties and cellular localization of chitin synthetase in Phycomyces blakesleeanus. J. Biol. Chem. 249, 1973-1979.

Jaworski, E., Wang, L. und Marco, G. (1963). Synthesis of chitin in cell-free extracts of Prodenia eridania. Nature 198, 790.

Jeuniaux, C. (1963). Chitine et Chitinolyse. Masson & Cie. Paris.

Keller, F. A. und Cabib, E. (1971). Chitin and yeast budding. Properties of chitin synthetase from Saccharomyces carlsbergiensis. J. Biol. Chem. 246, 160-166.

Leloir, L. F. und Goldemberg, S. H. (1960). Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. J. Biol. Chem. 235, 919-923.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Marks, E. P. und Leighton, T. (1980). Modes of action of inhibitors of cuticle formation in insect organ cultures. Abstracts 16. International congress of entomology, Kyoto. 64.

McMurrough, I., Flores-Carreon, A. und Bartnicki-Garcia, S. (1971). Pathway of chitin synthesis and cellular localization of chitin synthetase in Mucor rouxii. J. Biol. Chem. 246, 3999-4007.

McMurrough, I. und Bartnicki-Garcia, S. (1971). Properties of a particulate chitin synthetase from Mucor rouxii. J. Biol. Chem. 246, 4008-4016.

Moser, J. G. (1963). Über die Esteraseaktivität im Darm des Regenwurmes Lumbricus terrestris L. Diss. Math.-Nat. Fak. der F. U. Berlin.

Muzzarelli, R. A. A. (1977). Chitin. 1. Aufl. Pergamon Press. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.

Ohta, N., Kakiki, K. und Misato, T. (1970). Studies on the mode of action of polyoxin D: II. Effect of polyoxin D on the synthesis of fungal cell wall chitin. Agr. Biol. Chem. 34, 1224-1234.

Peters, W. (1968). Vorkommen, Zusammensetzung und Feinstruktur peritrophischer Membranen im Tierreich. Z. Morph. Tiere 62, 9-57.

Peters, W. (1968 b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an chitinhaltigen Strukturen. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Heidelberg 1967, Zool. Anz. Suppl. 31, 681-695.

Porter, C. A. und Jaworski, E. G. (1965). Biosynthesis of chitin during various stages in the metamorphosis of Prodenia eridania. J. Insect Physiol. 11, 1151-1160.

Porter, C. A. und Jaworski, E. G. (1966). The synthesis of chitin by particulate preparations of Allomyces macrogynus. Biochemistry 5, 1149-1154.

Prosser, C. L. und Brown, F. A. (1965). Comparative Animal Physiology. 2.Aufl. W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London.

Purchon, R. D. (1968). The biology of the mollusca. 1. Aufl. Pergamon Press. Oxford, London, New York, Edinburgh, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig.

Quesada-Allue, L. A., Maréchal, L. R. und Belocopitow, E. (1976). Chitin synthesis in Triatoma infestans and other insects. Acta physiol. latinoam. 26, 349-363.

Ranby, B. G. (1952). Physico-chemical investigations on animal cellulose (Tunicin). Ark. Kemi 4, 241-248.

Ray, P. M., Shininger, T. L. und Ray, M. M. (1969). Isolation of ß-Glucan synthetase particles from plant cells and identification with golgi membranes. Biochemistry 64, 605-612.

Reissig, J. L., Strominger, J. L. und Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217, 959-966.

Reynolds, E. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17, 208-213.

Rousset-Hall, de, A. und Gooday, G. W. (1975). A kinetic study of a solubilized chitin synthetase preparation from Coprinus cinereus. J. Gen. Microbiol. 89, 146-154.

Ruiz-Herrera, J. und Bartnicki-Garcia, S. (1974). Synthesis of wall microfibrils in vitro by a "soluble" chitin synthetase from Mucor rouxii. Science 186, 357-359.

Ruiz-Herrera, J., Sing, V. O., van der Woude. und Bartnicki-Garcia, S. (1975). Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2706-2710.

Ruiz-Herrera, J. und Bartnicki-Garcia, S. (1976). Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from Mucor touxii. J. Gen. Microbiol. 97, 241-249.

Ruiz-Herrera, J., Lopez-Romero, E. und Bartnicki-Garcia, S. (1977). Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of Mucor rouxii. J. Biol. Chem. 252, 3338-3343.

Salama, H. S., Motagally, Z. A. und Skatulla, U. (1976). On the mode of action of dimilin as a moulting inhibitor in some lepidopterous insects. Z. ang. Ent. 80, 396-407.

Sowa, B. A. und Marks, E. P. (1975). An in vitro system for the quantitative measurement of chitin synthesis in the cockroach: inhibition by TH 6040 and polyoxin D. Insect Biochem. 5, 855-859.

Stahl, E. (1967). Dünnschicht-Chromatographie. 2. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Surholt, B. und Zebe, E. (1972). In vivo Untersuchungen zur Chitinsynthese an Wanderheuschrecken. J. Comp. Physiol. 78, 75-82.

Surholt, B. (1975). Studies in vivo and in vitro on chitin synthesis during the larval-adult moulting cycle of the migratory locust, Locusta migratoria. J. Comp. Physiol. 102, 135-147.

Ulane, R. E. und Cabib, E. (1974). The activating system of chitin synthetase from Saccharomyces cerevisiae. Purification and properties of an inhibitor of the activating factor. J. Biol. Chem. 249, 3418-3422.

Ulane, R. E. und Cabib, E. (1976). The activating system of chitin synthetase from Saccharomyces cerevisiae. Purification and properties of the activating factor. J. Biol. Chem. 251, 3367-3374.

Vermeulen, C. A., Raeven, M. B. J. M. und Wessels, J. G. H. (1979). Localization of chitin synthase activity in subcellular fractions of Schizophyllum commune protoplasts. J. Gen. Microbiol. 114, 87-97.

Vierhaus, H. (1971). Über peritrophische Membranen und andere chitinhaltige Strukturen bei Anneliden, unter besonderer Berücksichtigung von Lumbricus terrestris L. Diss. Math.-Nat. Fak. der U. Düsseldorf.

Wang, M. C. und Bartnicki-Garcia, S. (1966). Biosynthesis of ß-1,3- and ß-1,6-linked glucan by Phytophtora cinnamoni hyphal walls. Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 832

Ward, C. und Wright, B. E. (1965). Cell-wall synthesis in Dictyostelium discoideum. I. In vitro synthesis from uridine diphosphoglucose. Biochemistry 4, 2021-2027.

G. Abbildungen

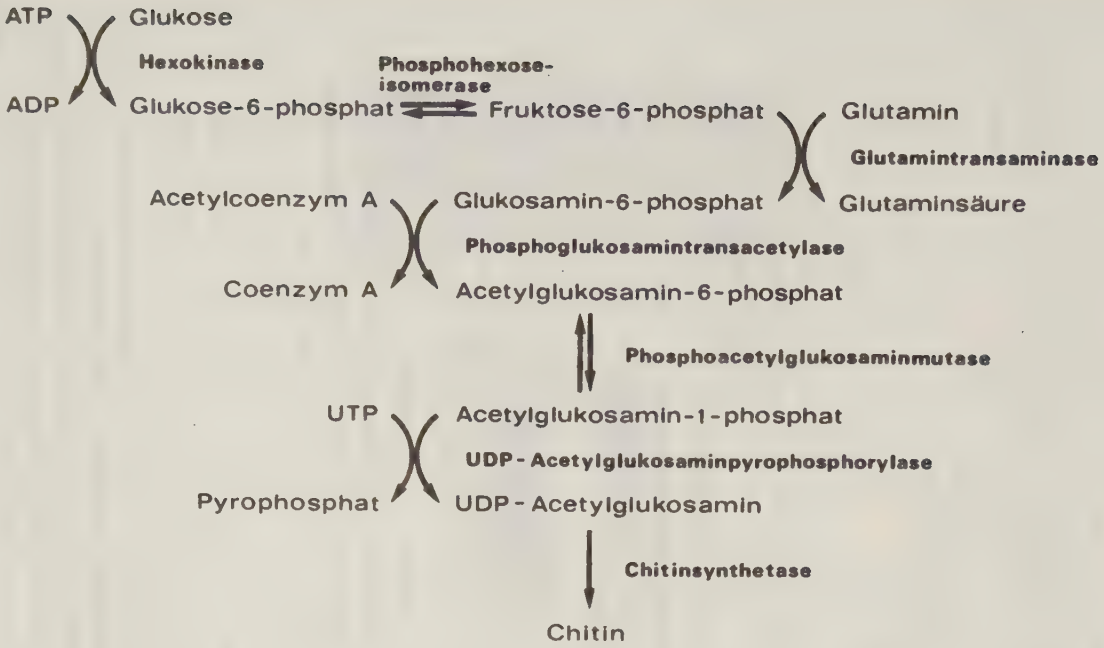


Abb. 1

Ablauf der Chitinsynthese (nach Candy und Kilby (1957) und Muzzarelli (1977).

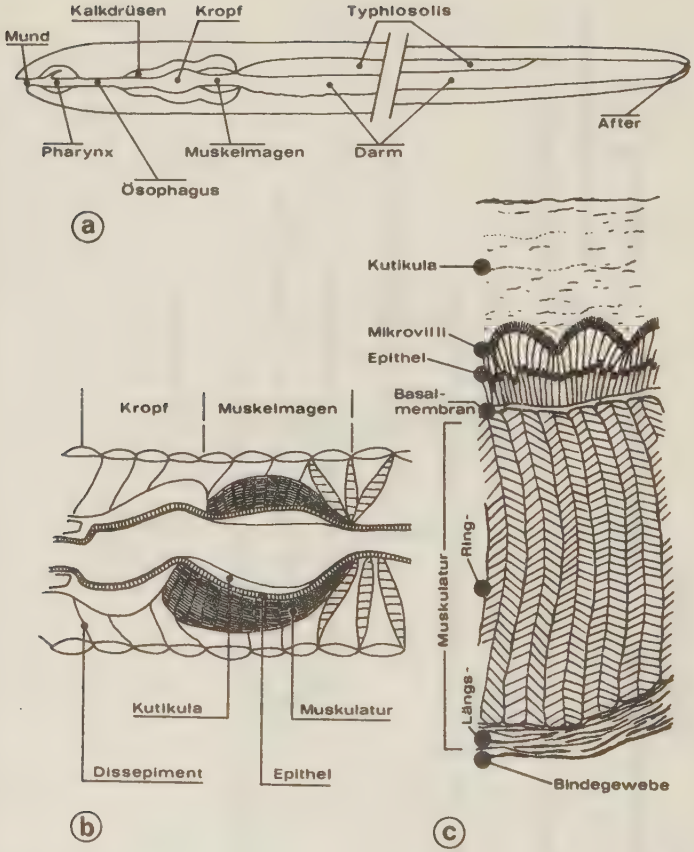


Abb. 2

2 a) Schematische Darstellung des Darmtrakts von Lumbricus terrestris (verändert nach Vierhaus).

2 b) Schematischer Längsschnitt durch Kropf und Muskelmagen von Lumbricus terrestris (nach Vierhaus, 1971).

2 c) Ausschnitt aus einem Längsschnitt durch den Muskelmagen.

Abb. 3 →

Abb. 3

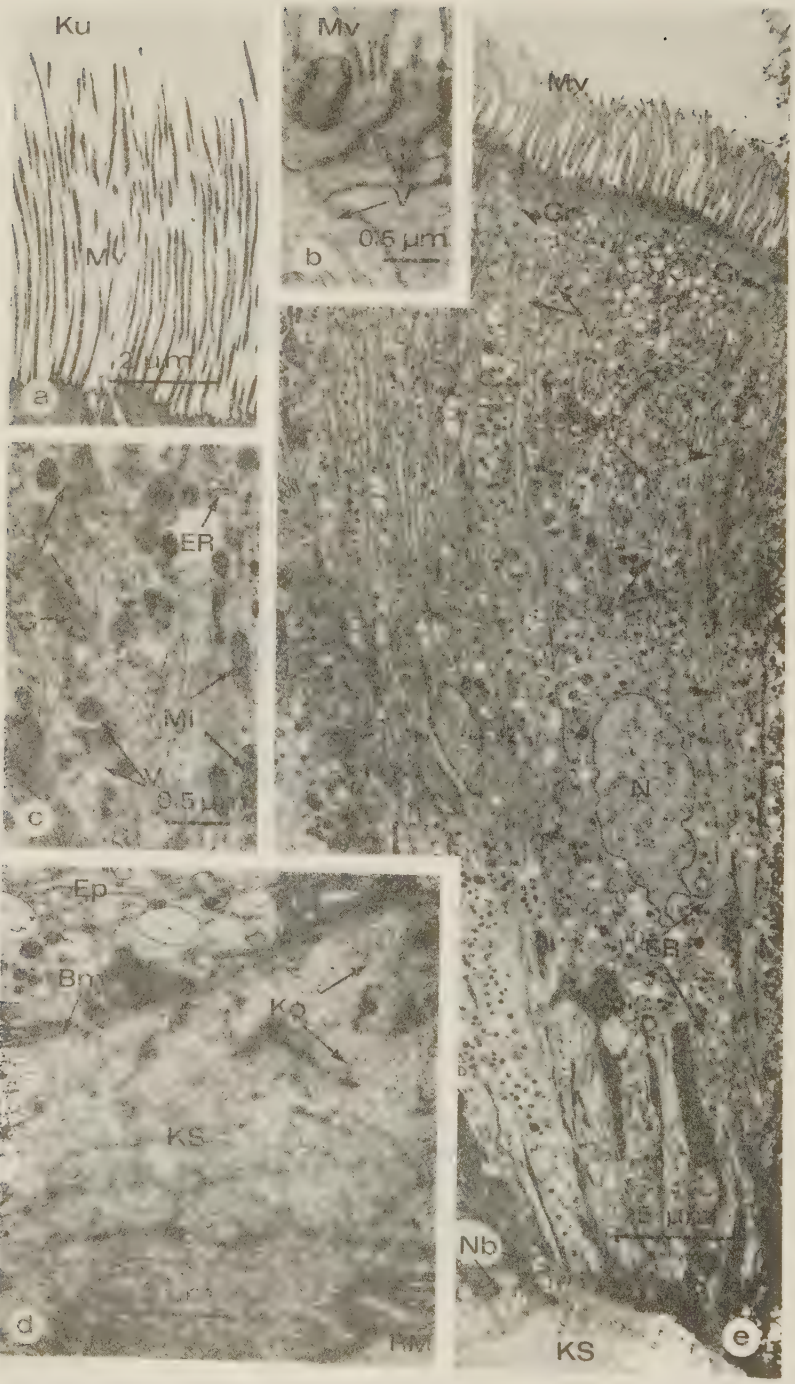
a) Längsschnitt durch das Epithel des Muskelmagens. Die auf die Mikrovilli (Mv) folgende Kutikula (Ku) ist nicht erkennbar. x 10600

b) Ausschnitt aus dem apikalen Bereich einer Epithelzelle. Es sind eine Anzahl kleiner Vesikel(V) erkennbar, die an einem Transport der Chitinsynthetase beteiligt sein könnten. x 22000

c) Ausschnittvergrößerung einer Epithelzelle. Neben Mitochondrien (Mi) und Vesikeln (V) sind Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Zisternenstapel des Golgiapparates (G) erkennbar. x 25200

d) Basalmembran zwischen Epithel (Ep) und Ringmuskulatur (RM). Deutlich sind Grenzlamelle (Bm) und Kollagenfibrillen (Ko) in der kollagenhaltigen Schicht (KS) zu erkennen. x 25200

e) Längsschnitt durch eine Epithelzelle des Muskelmagens. Die Pfeile geben den ungefähren Verlauf der Zellgrenzen (Gr) an, die nur im apikalen Bereich der Zelle deutlich erkennbar sind. Mitochondrien (Mi), Kern (N), Endoplasmatisches Retikulum (ER), Vesikel (V), Nervenbündel (Nb), kollagenhaltige Schicht (KS). x 5000


Ku
Mv
a
2 µm
Mv
V
0.5 µm
b
Mv
Cr
Cr
ER
Mi
V
0.5 µm
c
N
ER
Ep
Bm
Kp
KS
d
Pm
Nb
KS
e

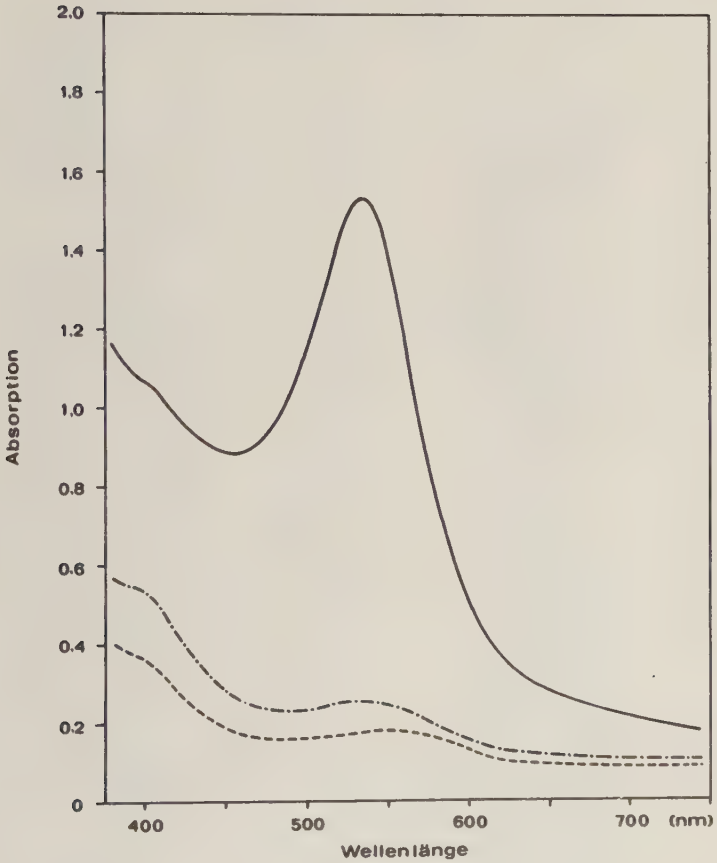


Abb.4

Mucopolysaccharide in der Kutikula des Muskelmagens. Absorptionsspektren nach Anwendung des Carbazoltests (Bitter und Muir, 1962). (———) unbehandelte Kutikula; (-·-·-) SDS/ Harnstoff-extrahierte Kutikula; (-----) NaOH-extrahierte Kutikula.

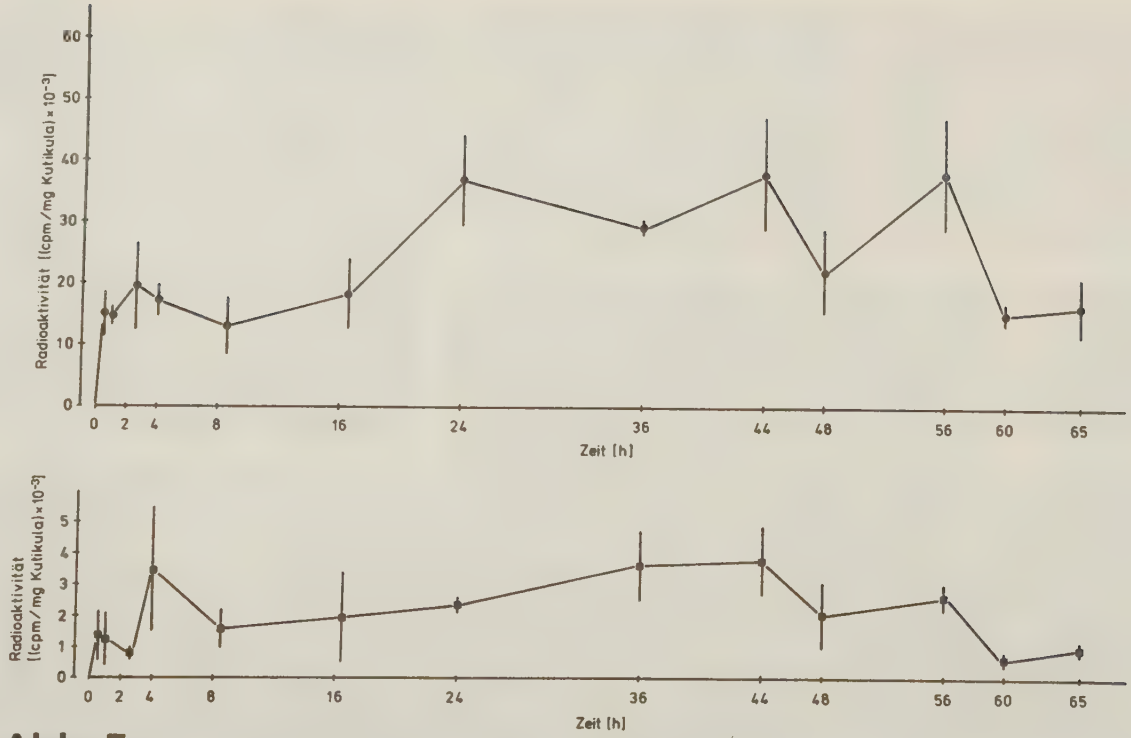

Radioaktivität [(cpm/mg Kutikula) × 10⁻³]
60
50
40
30
20
10
0
0 2 4 8 16 24 36 44 48 56 60 65
Zeit [h]
Radioaktivität [(cpm/mg Kutikula) × 10⁻³]
5
4
3
2
1
0
0 2 4 8 16 24 36 44 48 56 60 65
Zeit [h]

Abb. 5

Abb. 5

Einbau von radioaktiv markiertem Material in die Kutikula des Muskelmagens nach Injektion von ^{14}C - Glukose. (●———●) Radioaktivität im Chitin der Kutikula. (■———■) Radioaktivität im NaOH - Extrakt der Kutikula, der Proteine und Mucopolysaccharide repräsentiert. Jeder Punkt ist der Mittelwer aus 5 bis 6 Einzelmessungen.

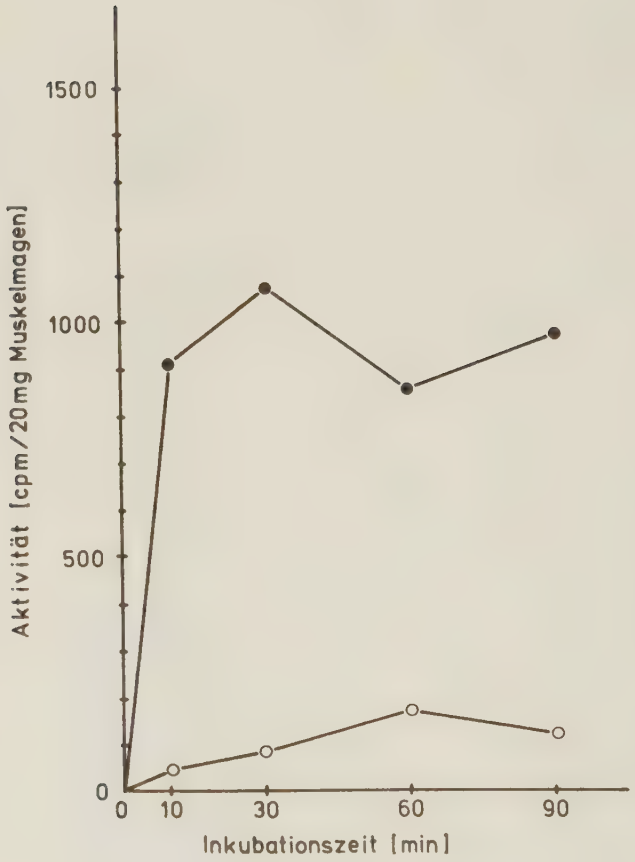


Abb. 6

Umsatz von UDP - ^{14}C - GlcNAc durch ganze Muskelmägen. (○———○) ohne und (●———●) in Gegenwart von 0,5% Triton X-100. Die Punkte stellen das Mittel aus vier Messungen dar.

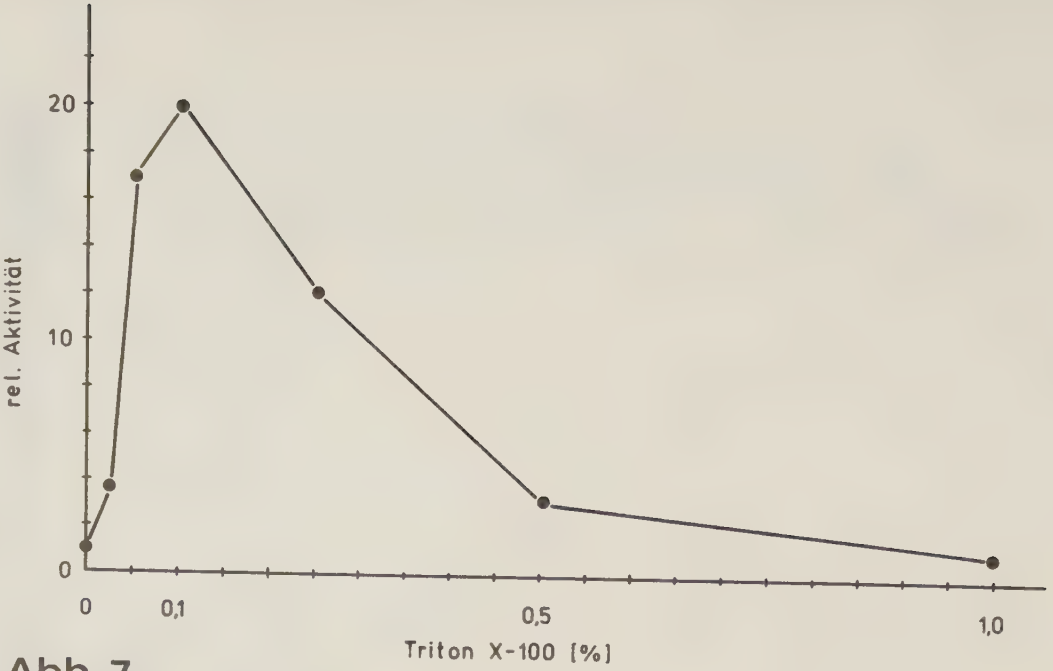


Abb. 7

Aktivität der Chitinsynthetase im Epithelhomogenat bei unterschiedlichen Konzentrationen von Triton X-100. Die Werte sind auf das unbehandelte Homogenat (relative Aktivität = 1,0) bezogen. Inkubation 30 Minuten bei 25°C. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus drei Experimenten.

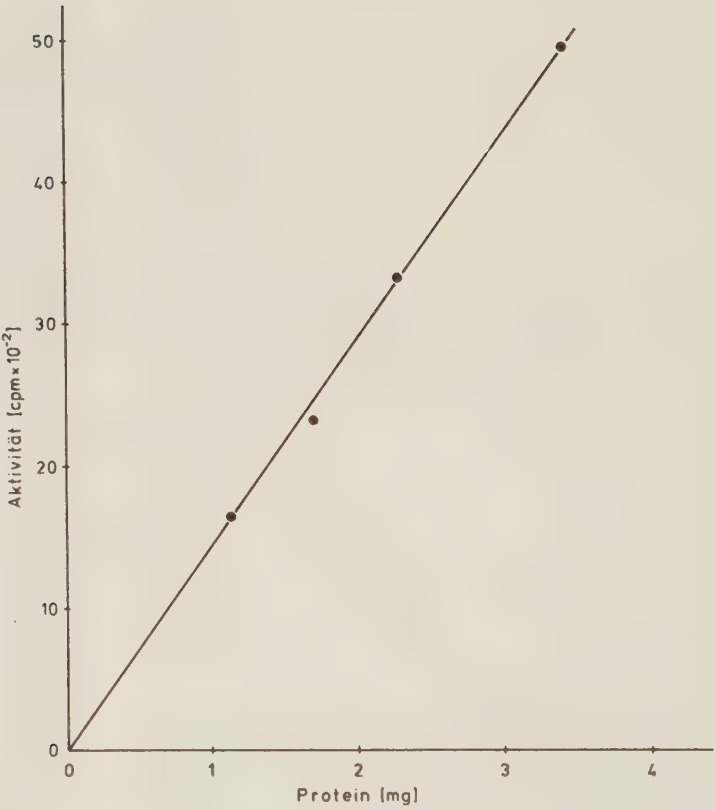


Abb. 8

Aktivität der Chitinsynthetase des Regenwurms in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Inkubation 30 Minuten bei 25°C.

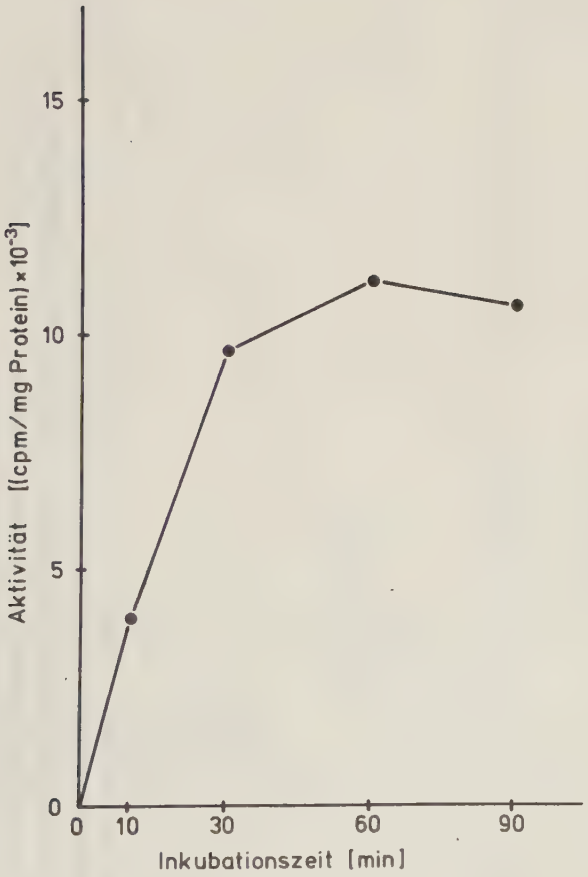


Abb. 9

Aktivität der Chitinsynthetase im Epithelhomogenat in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Abb. 10

Bestimmung der Michaelis-Konstanten der Chitinsynthetase des Regenwurms im Epithelhomogenat mittels eines Lineweaver-Burke Diagramms. Infolge der Begleitstoffe (z.B. UDP) im Homogenat dürfte die isolierte Chitinsynthetase einen höheren K_m- Wert als 1,09 mM/ dm^3 haben. Inkubation 30 Minuten bei 25°C mit 0,5, 1,0, 2,0 und 4,0 mM UDP - GlcNAc als Substrat.

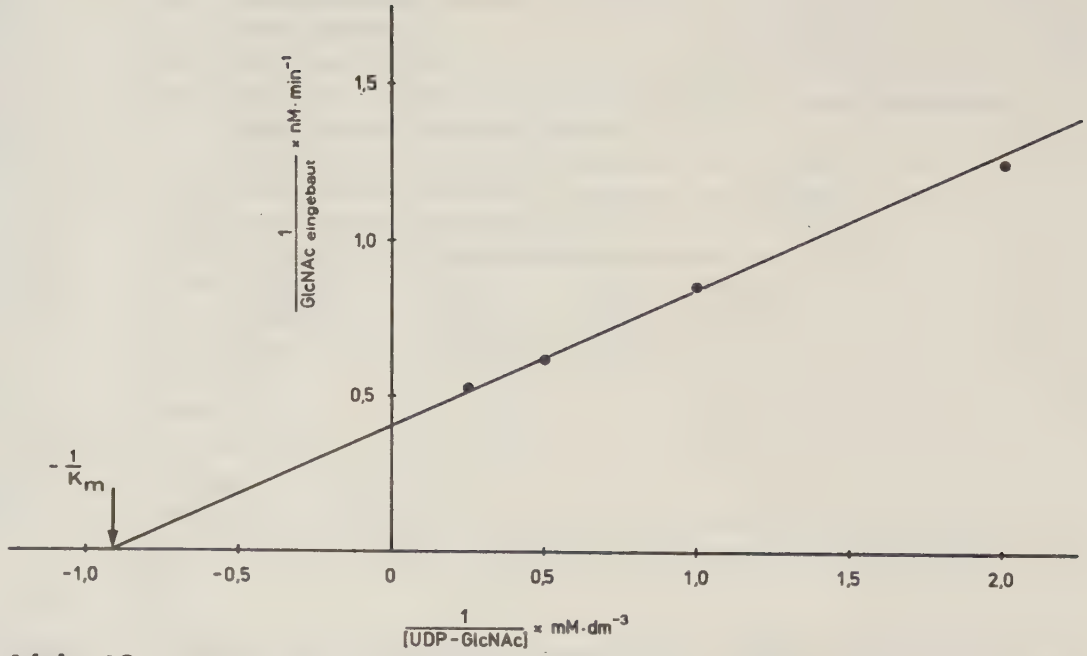

1,5
1,0
0,5
$\frac{1}{\text{GlcNAc eingebaut}} \times nM \cdot min^{-1}$
$-\frac{1}{K_m}$
-1,0
-0,5
0
0,5
1,0
1,5
2,0
$\frac{1}{[UDP-GlcNAc]} \times mM \cdot dm^{-3}$

Abb. 10

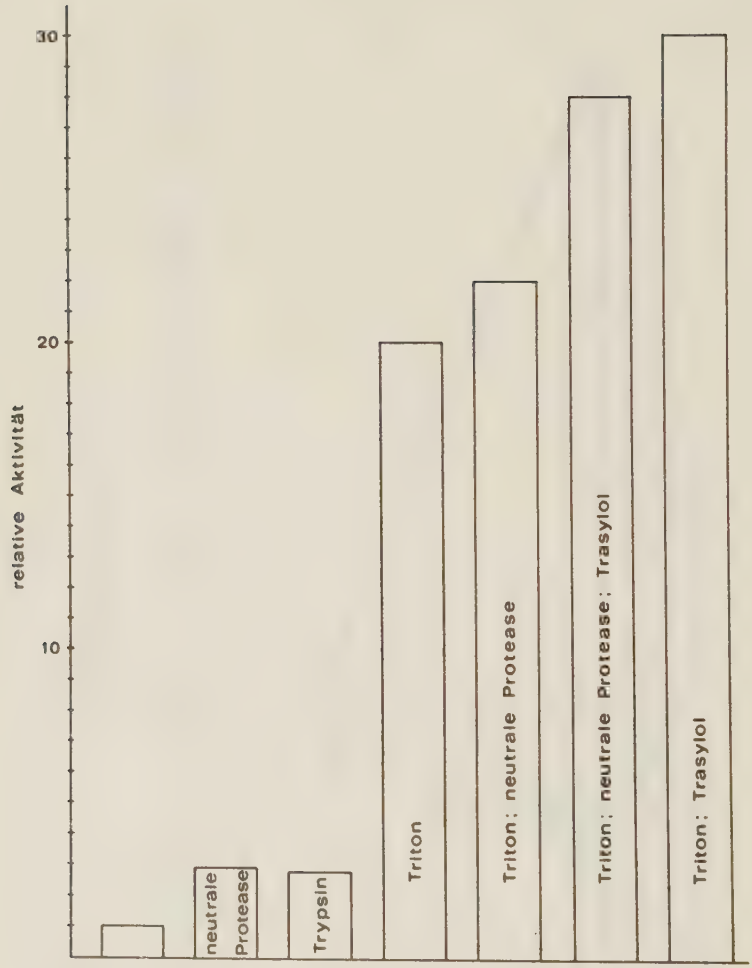


Abb. 11 Die Wirkung von neutraler Protease (60 µg/ml), Trypsin (5 µg/ml), Triton X-100 (0,1%) und des Proteaseinhibitors Trasylol (4000 U/ml) auf die Aktivität der Chitinsynthetase im Epithelhomogenat. Inkubation 30 Minuten bei 25°C. Die Werte sind das Mittel aus je vier Meßwerten.

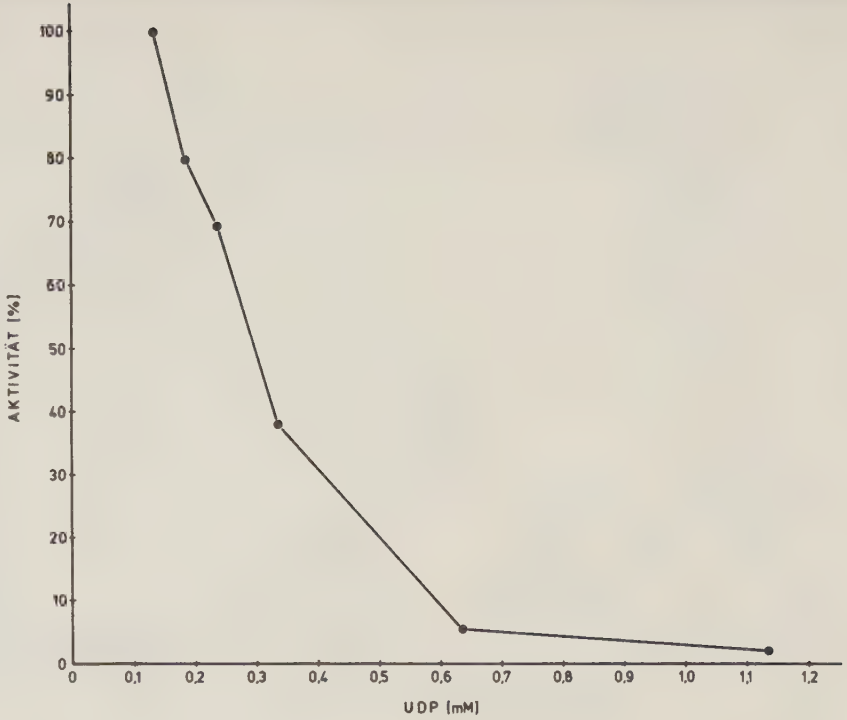


Abb. 12

Hemmung der Chitinsynthetase des Regenwurms durch das Nukleotid UDP. Die Aktivität des Homogenats bei einer UDP-Konzentration von 0,16 mM (endogenes UDP) wurde gleich 100% gesetzt. Alle Punkte stellen die Mittelwerte aus je 5 Einzelmessungen dar.

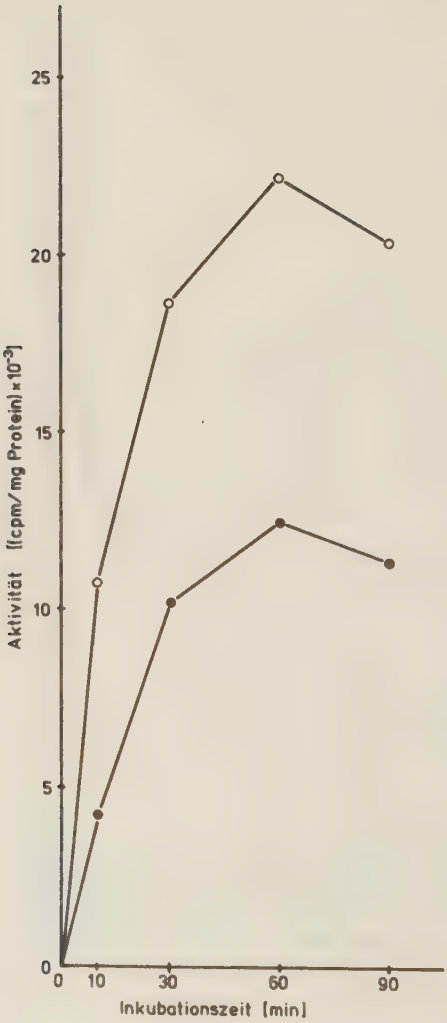
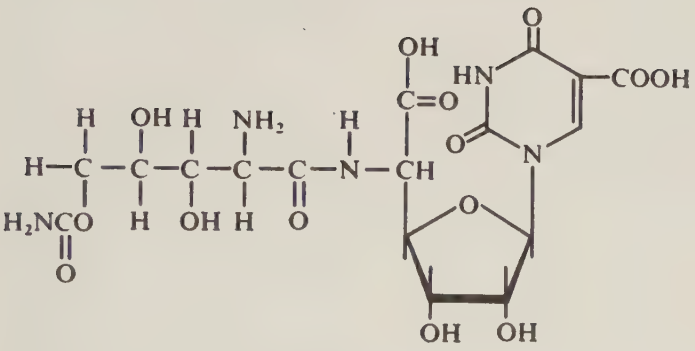
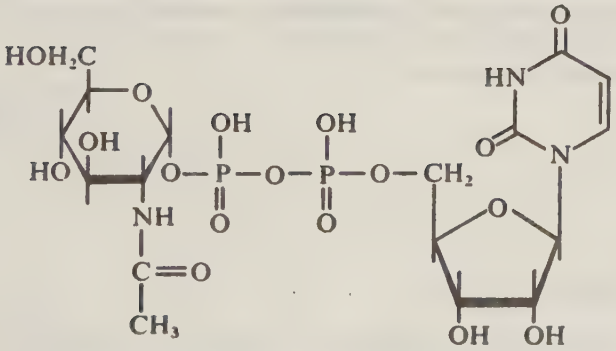


Abb. 13 Erhöhung der Aktivität der Chitinsynthetase durch Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. (●——●) ohne, (o——o) mit PK und PEP. Es sind die Mittelwerte aus zwei Präparationen aufgetragen.



Polyoxin D



UDP-N-Acetylglukosamin

Abb. 14 Strukturformeln des Substrats der Chitinsynthetase, UDP - N -Acetylglukosamin, und ihres kompetitiven Inhibitors, Polyoxin D (nach Isono, Asahi und Suzuki, 1969).

Abb. 15

Hemmung der Chitinsynthetase des Regenwurms durch Polyoxin D. (●———●) in Gegenwart von 3 mM EDTA und (o———o) 3 mM EGTA. Alle anderen Versuchsbedingungen waren unverändert. Inkubation 30 Minuten bei 25°C. Jeder Punkt ist das Mittel aus je sechs Einzelwerten.

Abb. 16

Hemmung der Chitinsynthetase durch das Insektizid Dimilin. Das Inkubationsmedium enthielt 3 mM EDTA. Inkubation 30 Minuten bei 25°C.

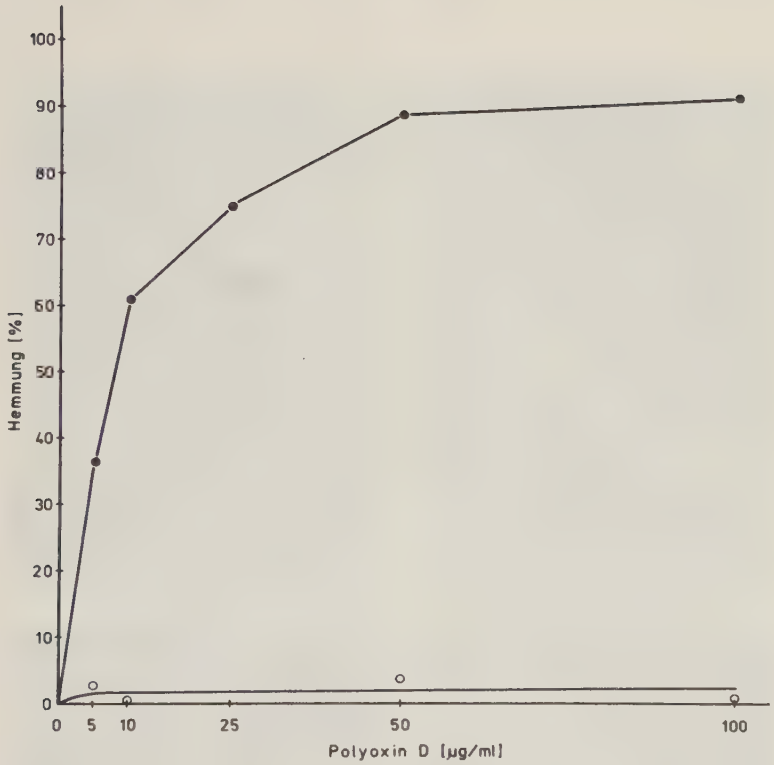

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Hemmung [%]
0
5
10
25
50
100
Polyoxin D [µg/ml]

Abb. 15

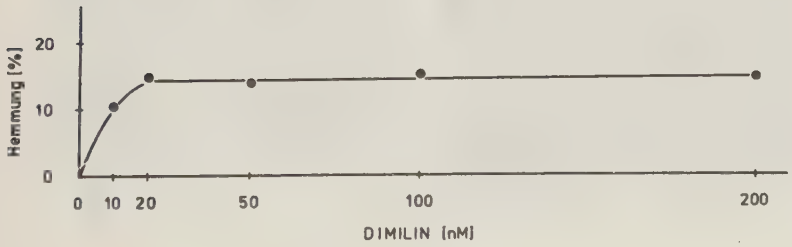

20
10
0
Hemmung [%]
0
10
20
50
100
200
DIMILIN [nM]

Abb. 16

Abb. 17 →

Abb. 17

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten durch das 6200 x g - Pellet des Epithelhomogenats.

Die Abb. 17 a)- c) zeigen, daß das Pellet Mitochondrien (Mi), Vesikel (V), Kerne (N), Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Reste der Muskulatur (Mu) des Magens enthält.
a) x 22500; b) x 8000; c) x 60500

Auf Abb. 17 d) sind ein Teil der zerstörten Grenzlamelle (Bm) sowie Kollagenfibrillen aus der kollagenhaltigen Schicht erkennbar. x 115000

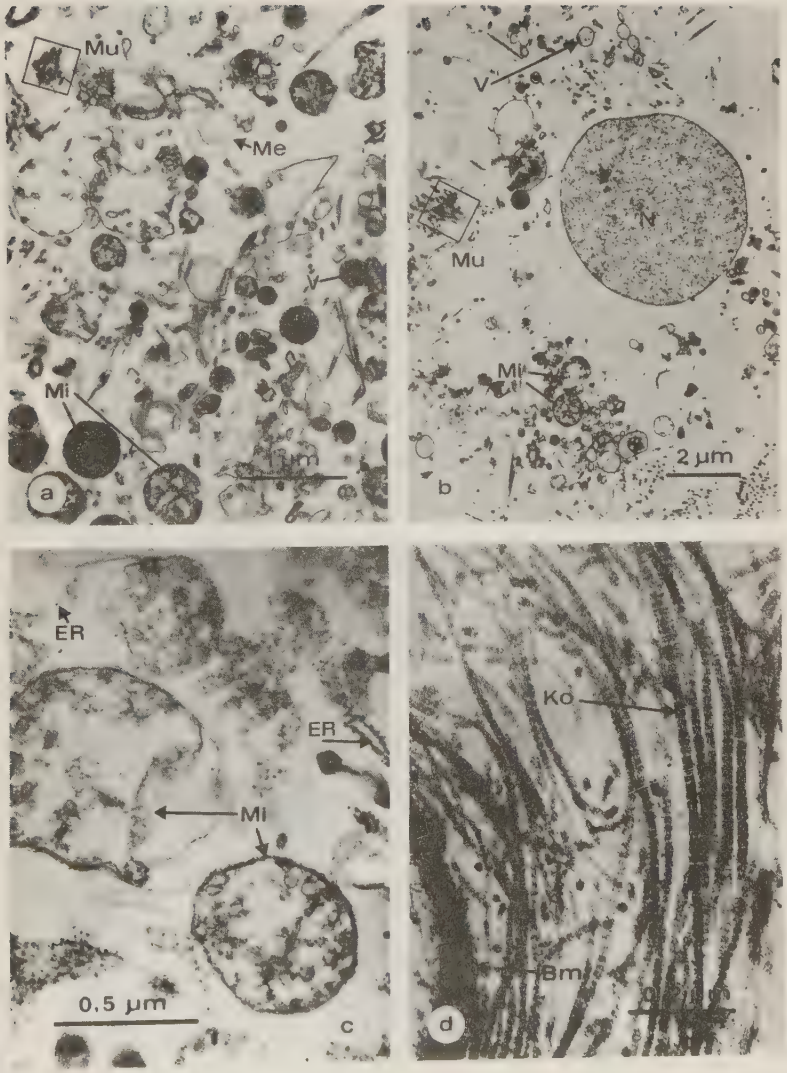

Mu
Me
V
Mi
1 µm
a
V
N
Mu
Mi
2 µm
b
ER
ER
Mi
0,5 µm
c
Ko
Bm
d

Abb. 18 →

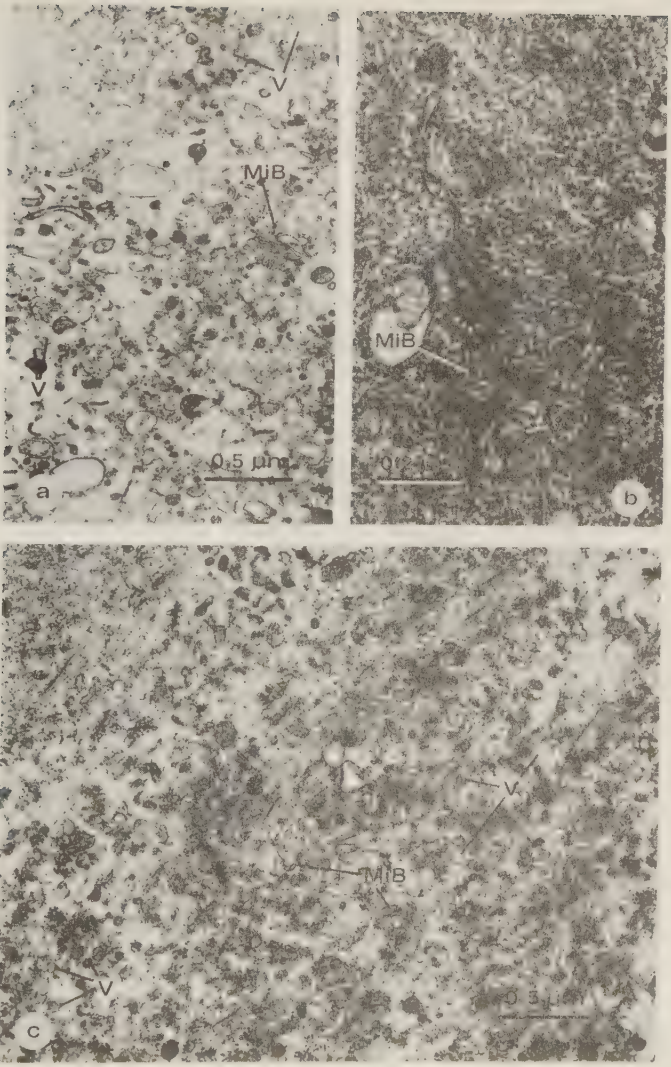
Abb. 18

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten der Mikrosomenfraktion (100 000 x g - Pellet) des Epithelhomogenats.

a) Zone des Pellets mit Vesikeln (V), Mitochondrienbruchstücken (MiB), wenigen Ribosomen und Membranfragmenten. x 36000

b) Stark ribosomenhaltige Zone des gleichen Pellets. Daneben sind Vesikel (V) und einige Mitochondrienbruchstücke (MiB) erkennbar. x 85000

c) Übergangszone zwischen den in Abb. 18 a und b gezeigten Zonen des Pellets. x 45500


V
MiB
V
0,5 µm
a
MiB
b
V
MiB
V
c

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Peters gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und seine Ratschläge bei der Durchführung. Weiterhin möchte ich allen Biologen meinen Dank aussprechen, die auf anderen Gebieten der Zoologie arbeiten, und trotzdem Zeit fanden, mit mir über Versuchsergebnisse zu diskutieren.
Mein Dank gilt auch der Firma Bayer AG für die Beschaffung von Trasylol und Dimilin sowie der Firma Kaken Chemical Co, Ltd., Tokio, Japan für eine Probe des Antibiotikums Polyoxin D.

Lebenslauf

Geboren wurde ich, Volker Walldorf, am 24.1.1948 in Hohenlimburg als Sohn des Verwaltungsangestellten Heinz Walldorf und seiner Frau Elfriede, geborene Becker. Nach dem Umzug nach Düsseldorf wurde ich dort Ostern 1954 in die evangelische Knabenschule an der Helmholtzstraße eingeschult. Ab Ostern 1958 besuchte ich das mathematisch-naturwissenschaftliche Lessing-Gymnasium, Düsseldorf, bis zum Abitur am 27.5.1968. Zum 1.10.1968 wurde ich zur Ableistung des Wehrdienstes zur Bundeswehr eingezogen und am 31.3.1970 entlassen. Im Sommersemester 1970 begann ich mit dem Biologie-Studium an der Universität Düsseldorf. Im April 1973 legte ich die Vordiplomprüfung, am 15.2.1977 die Diplomprüfung in Biologie ab. Mitte 1977 begann ich im Institut für Zoologie II der Universitaet Düsseldorf mit der Promotion.